



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INTERAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT-PG NO DESENVOLVIMENTO E
COMPETÊNCIA DO EMBRIÃO MURINO

MARTA SOFIA PAVÃO CERVEIRA PINTO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da Silva

Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres

ORIENTADORA

Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres

2018
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INTERAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT-PG NO DESENVOLVIMENTO E
COMPETÊNCIA DO EMBRIÃO MURINO

MARTA SOFIA PAVÃO CERVEIRA PINTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da Silva

Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres

ORIENTADORA

Doutora Ana Catarina Belejo Móra Torres

2018
LISBOA

“Alma minha gentil, que te partiste
Tão cedo desta vida descontente,
Repousa lá no Céu eternamente”

- Luís de Camões -

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Luís Lopes da Costa, enquanto chefe da secção de Reprodução e Obstetrícia, por ter aceite o meu estágio na secção e por todos os ensinamentos que me transmitiu ao longo do curso e do estágio.

Com igual importância, à minha orientadora, Professora Doutora Ana Catarina Torres, por todos os ensinamentos que me transmitiu ao longo do estágio, toda a dedicação na elaboração do trabalho que originou esta dissertação e, por fim, por toda a amizade que me dedicou neste último ano.

À Mestre Mariana Batista gostaria de deixar o meu profundo agradecimento por tudo o que me ensinou no laboratório e todo o tempo que dedicou a ajudar-me na elaboração deste trabalho, mas também por toda a amizade e companhia que me dedicou em todos os bons e maus momentos deste longo ano.

Ao Doutor João Nestor por toda a paciência e disponibilidade e por todos os ensinamentos que me transmitiu.

A todos os restantes elementos da secção de Reprodução e Obstetrícia, Professora Doutora Luísa Mateus, Doutora Elisabete Silva e Mestre Patrícia Diniz, por todos os bons momentos passados, por toda a disponibilidade prestada e por toda a ajuda no laboratório. Também aos mais recentes alunos de doutoramento na secção, Mestre Marta Silva e Mestre Gonçalo Pereira. Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) pelo apoio financeiro e a todos os que trabalham no laboratório pela ajuda que sempre concederam.

Aos tratadores, Carlos, João e Jorge, que sempre tão prontamente se disponibilizaram para ajudar com as “pestes” com quem lidamos diariamente.

Aos meus colegas de curso, em especial à Mara Nunes, à Joana Simão, à Catarina Gomes e à Vanessa Fagundes, por todos os bons momentos e companheirismo ao longo destes últimos 6 anos.

Por fim, mas com tamanha importância, à minha família e a ti, Jorge, companheiro de uma vida, sem os quais teria sido impossível ultrapassar todos os obstáculos que se interpuseram nesta longa jornada.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto CIISA UID/CVT/00276/2013 – CIISA3/2016, tendo sido financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

RESUMO

Interação das vias de sinalização WNT-PG no desenvolvimento e competência do embrião murino

A mortalidade embrionária precoce em humanos, que ocorre frequentemente devido a erros antes, durante ou imediatamente após a implantação, é uma preocupação mundial com grandes implicações sociais e económicas. A via das prostaglandinas (PGs) é uma das vias de sinalização mais estudada com influência nos processos de implantação e de espaçamento dos embriões. A via Wnt canónica desempenha um papel importante em vários eventos do desenvolvimento embrionário e na preparação do útero para a receção do embrião. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi inferir sobre uma possível interação entre estas duas vias de sinalização, já reportada noutros sistemas biológicos, e caracterizar o padrão de transcrição dos elementos da via de produção das PGs no embrião murino ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação.

Em relação à transcrição dos genes associados à via das PGs nos embriões, verificou-se um padrão crescente do nível de transcrição da *COX-1* ao longo do desenvolvimento embrionário e ausência de transcrição de *COX-2* em todos os estadios analisados. Observou-se ainda um aumento significativo ($p < 0,05$) na transcrição da *cPGES* e *mPGES-2* nos blastocistos eclodidos, e da *mPGES-1* e *PGFS* nos blastocistos expandidos. No que diz respeito ao bloqueio da via Wnt pelo Dkk1, um inibidor da via Wnt canónica, não foram registadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos estudados para nenhum dos genes ou dos estadios de desenvolvimento analisados.

O padrão de transcrição dos genes associados à via das PGs no embrião murino foi, tanto quanto sabemos, descrito pela primeira vez neste trabalho, tendo-se concluído que a PGE_2 parece ser a PG com maior nível de transcrição nos estadios estudados, indicando a sua importância no desenvolvimento embrionário pré-implantação, no processo de eclosão e na aquisição de competência do embrião para a implantação. Além disso, parece existir nesta espécie uma preferência pela via COX-1/PGES para a síntese de PGE_2 , tanto no embrião como no endométrio. A análise da transcrição nos locais de implantação, também evidenciou a PGE_2 como a PG com maior importância. Por fim, não foi encontrada nenhuma interação entre as vias de sinalização Wnt-PG no desenvolvimento e competência do embrião para a implantação.

Palavras-chave: Murganho; Embrião; Implantação; Transcrição; Prostaglandinas; Wnt.

ABSTRACT

Wnt-PG pathways communication in the murine embryo development and competence

Early pregnancy loss in humans, which is often due to defects that occur before, during or immediately after implantation, is a worldwide social and economic concern. The prostaglandin (PG) pathway is one of the most extensively studied signal pathways that influence embryo implantation and embryo spacing. The canonical Wnt pathway plays an important role in multiple embryo development events and in uterine decidualization. Therefore, the objective of this work was to evaluate the communication of Wnt and PG pathways, that was already established for other biological systems, and to characterize the transcriptional pattern of PG associated genes in the murine pre-implantation embryo.

In this work, we observed a pattern of increasing transcription of *COX-1* mRNA throughout pre-implantation embryo development and an absence of *COX-2* transcription in all the analyzed embryos. Moreover, there was a significant increase ($p < 0,05$) of *cPGES* and *mPGES-2* transcription in hatched blastocysts, and a significant increase ($p < 0,05$) of *mPGES-1* and *PGFS* in expanded blastocysts. Regarding the blockade of the canonical Wnt pathway with Dkk1, there were no significant differences ($p > 0,05$) for any of the genes in any of the observed embryo developmental stages.

To the best of our knowledge, the transcriptional pattern of PG associated genes in the murine pre-implantation embryo was described here for the first time. PGE₂ seems to be the major PG involved in mouse pre-implantation embryo development, hatching process and acquisition of competence for implantation. Furthermore, our results suggest a preference for the COX-1/PGES pathway in PGE₂ synthesis in both the embryo and uterus. The transcriptional analyses of the implantation sites also revealed PGE₂ as the major PG involved in pre-implantation embryo development. Finally, there was no evidence of an interaction between Wnt and PG signaling pathways in the murine embryo development and competence.

Keywords: Mouse; Embryo; Implantation; Gene transcripts; Prostaglandins; Wnt

ÍNDICE

I. Relatório de estágio	1
II. Introdução	5
1. Relevância e justificação do trabalho	5
2. Objetivos	6
III. Revisão Bibliográfica	7
1. Características reprodutivas do murganho	7
2. Desenvolvimento do embrião murino no período pré-implantação	8
3. Implantação	10
4. Técnicas de recolha, transferência e avaliação dos embriões	12
4.1. Recolha de embriões em murganho	12
4.2. Transferência de embriões em murganho	13
4.3. Avaliação dos embriões	13
5. Via das prostaglandinas	15
5.1. COX	15
5.2. PG sintases	16
5.2.1. PGES	16
5.2.2. PGIS	17
5.2.3. PGFS	17
5.3. PGs no embrião e no endométrio até à implantação	17
6. Via Wnt	20
6.1. Sinalização Wnt/ β -catenina nos eventos peri-implantação	21
7. Interação entre as vias de sinalização Wnt-PG	23
IV. Materiais e Métodos	25
1. Desenho experimental	25
1.1. Obtenção e caracterização da amostra	25
1.2. Análise da transcrição de genes relevantes	26
2. Extração de ARN e síntese de ADNc	26
2.1. Embriões	26
2.2. Endométrio	27
3. Avaliação da transcrição de genes	27
3.1. Oligonucleótidos iniciadores	27
3.2. qRT-PCR	28
4. Análise estatística	29
V. Resultados	30
1. Transcrição de genes associados à via das PGs pelo embrião	30
2. Transcrição de genes associados à via das PGs pelo endométrio	35
VI. Discussão	36
VII. Conclusão	43
VIII. Bibliografia	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimentos técnicos na área da Reprodução dos machos	2
Figura 2 – Procedimentos técnicos na área da Reprodução das fêmeas	2
Figura 3 - Aparelho genital feminino de bovino, recolhido em matadouro	3
Figura 4 - Casos clínicos acompanhados durante o estágio	4
Figura 5 - Desenvolvimento embrionário no período pré-implantação	9
Figura 6 - Embriões de ratinho de grau I em diferentes fases do desenvolvimento embrionário	14
Figura 7 – Esquema ilustrativo da síntese de prostaglandinas	15
Figura 8 – Esquema ilustrativo da sinalização Wnt	20
Figura 9 – Via Wnt nos eventos peri-implantação	22
Figura 10 – Níveis de transcrição da <i>COX-1</i> nos três estádios analisados	32
Figura 11 – Níveis de transcrição da <i>cPGES</i> nos três estádios analisados	33
Figura 12 – Níveis de transcrição da <i>mPGES-1</i> e da <i>mPGES-2</i> nos três estádios analisados	34
Figura 13 – Níveis de transcrição da <i>PGFS</i> nos três estádios analisados	35
Figura 14 – Níveis de transcrição da <i>PGIS</i> nos três estádios analisados	35
Figura 15 - Efeito do tratamento dos embriões com Dkk1 nos níveis de transcrição pelos LI dos genes associados à via das PGs	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedimentos técnicos observados durante o estágio curricular na área da reprodução de bovinos e equinos	1
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados para as reações de qRT-PCR	28
Tabela 3 – Resultados (valores de p) da ANOVA fatorial utilizada para analisar o nível de transcrição dos genes alvo nos embriões	30
Tabela 4 - Resultados (valores de p) do teste T de amostras independentes para o nível de transcrição dos genes alvo nos locais de implantação	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SIMBOLOS

ADN	– ácido desoxirribonucleico
ADNc	– ADN complementar
AINEs	– anti-inflamatórios não esteroides
AKRs	– aldo-keto-redutases
ANOVA	– análise de variância
ARN	– ácido ribonucleico
ARNm	– ARN mensageiro
BCL	– blastocisto eclodido
BEX	– blastocisto expandido
BL	– blastocisto
Ca ⁺	– íão cálcio
Cl ⁻	– íão cloro
CIISA	– Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CL	– corpo lúteo
COX-1	– ciclo-oxigenase-1
COX-2	– ciclo-oxigenase-2
cPGES	– <i>cytosolic prostglandin E synthase</i>
DAPT	– N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
Dkk1	– <i>Dickkopf protein 1</i>
dpc	– dias pós-coito
eCG	– gonadotrofina coriônica equina
FIV	– fertilização <i>in vitro</i>
FMV-UL	– Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
FW	– <i>forward</i>
FZD	– <i>G-protein coupled transmembrane frizzled receptors</i>
hCG	– gonodotrofina coriônica humana
IA	– inseminação artificial
ICM	– <i>inner cell mass</i> (ou botão embrionário)
IETS	– <i>International Embryo Transfer Society</i>
K ⁺	– íão potássio
LI	– locais de implantação
LRP	– <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
LSD	– <i>least significant difference</i> (ou diferença mínima significativa)

MC – mórula compacta
mPGES1 – *microsomal prostaglandin E synthase-1*
mPGES2 – *microsomal prostaglandin E synthase-2*
Na⁺ – íão sódio
ng – nanograma
P₄ – progesterona
PCP – *planar cell polarity*
PG – prostaglandina
PGs – prostaglandinas
PCR – reação em cadeia da polimerase
PGD₂ – prostaglandina D₂
PGDS – *prostaglandin D synthase*
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGES – *prostaglandin E synthase*
PGF_{2α} – prostaglandina F_{2α}
PGFS – *prostaglandin F Synthase*
PGH₂ – prostaglandina H₂
PGI₂ – prostaciclina
PGIS – *prostaglandin I synthase*
PLA₂ – fosfolipase A₂
qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real
Rácio ICM:TE – Rácio botão embrionário:trofoectoderme
RPS29 – *ribosomal protein S29*
RT – transcriptase reversa
RV – *reverse*
SEM – *standart error mean* (ou erro padrão da media)
sFRP – *secreted FZD related proteins*
TE – trofoectoderme
TRA – técnicas de reprodução assistida
TXA – tromboxano
TXS – tromboxano sintase
u.a. – unidades arbitrárias

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular decorreu entre setembro de 2016 e julho de 2017 na Secção de Reprodução e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), com duas vertentes distintas: uma vertente na área Clínica e outra na área da Investigação Científica. Quanto à parte clínica, foi-me possível observar e participar em vários procedimentos técnicos da área da Reprodução de bovinos e equinos (Tabela 1), realizando exames ginecológicos, por palpação transrectal e por ultrassonografia, nas duas espécies; observei e realizei a técnica de inseminação artificial em bovinos e participei nas inseminações artificiais realizadas em equinos, com sémen refrigerado e criopreservado; observei e acompanhei protocolos de transferência de embriões, desde o estabelecimento do calendário de sincronização da dadora com as recetoras até à lavagem, pesquisa e transferência dos embriões nas duas espécies; participei em protocolos de criopreservação de embriões bovinos; observei e realizei exames andrológicos, com colheita de sémen pelas técnicas de electroejaculação (em bovinos), com manequim natural (em bovinos e equinos) e com manequim artificial (equinos), e posterior realização de espermograma; observei e participei em protocolos de criopreservação de sémen, nas duas espécies (figuras 1 e 2).

Tabela 1– Procedimentos técnicos observados durante o estágio curricular, na área da reprodução de bovinos e equinos

Procedimentos técnicos	Bovinos	Equinos
Exame ginecológico	100 / 58*	281 / 79*
Diagnóstico de gestação	10	14
Citologia uterina	0	9
Inseminação artificial		
- Sémen refrigerado	NA	5
- Sémen criopreservado	8	12
Lavagem uterina para recolha de embriões	4	3
Transferência de embriões	23	0
Criopreservação de embriões (sessões)	1	0
Exame Andrológico	10	9
Colheita de sémen	10	17
Criopreservação de sémen (sessões)	2	8

NA - Não Aplicável; *Procedimentos realizados pelo autor

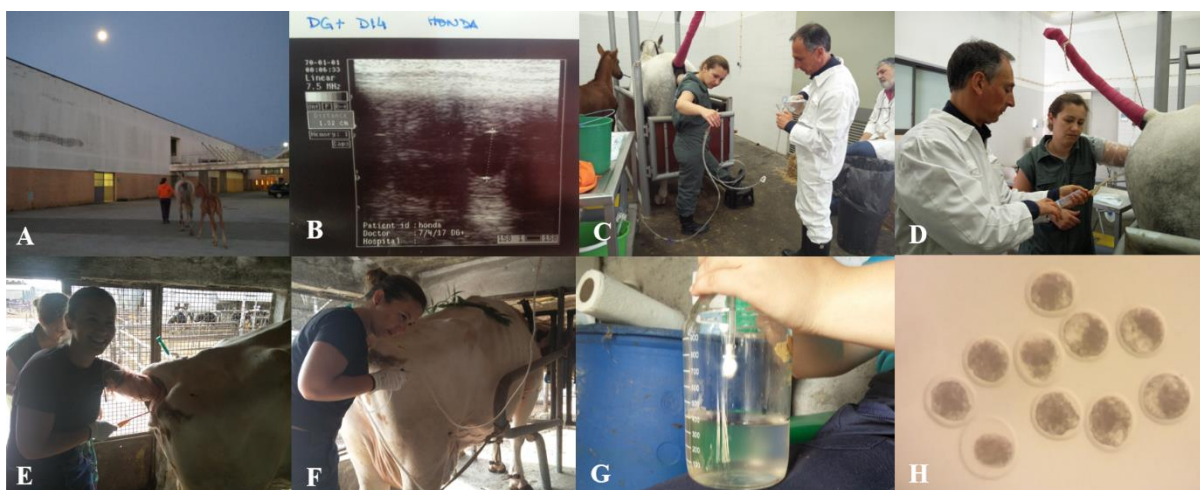
Figura 1 – Procedimentos técnicos na área da Reprodução em machos



A – Exame andrológico (bovino); **B** – Recolha de sémen com manequim natural (equino); **C** – Avaliação morfológica de espermatozoides (bovino).

O elevado número de exames ginecológicos observados e realizados em éguas, comparativamente aos realizados em bovinos, prende-se em grande parte com o propósito dos mesmos. A maioria dos exames ginecológicos em equinos destinou-se a determinar o momento da ovulação para se proceder à inseminação artificial com sémen criopreservado. Já nos bovinos, estes exames destinaram-se sobretudo à avaliação, quer do início da ciclicidade em novilhas e vacas no pós-parto, quer da sincronia recetoras-dadora em programas de transferência de embriões.

Figura 2 – Procedimentos técnicos na área da Reprodução em fêmeas



A – Avaliação ecográfica (de 4-4 horas) para controlo do momento da ovulação e IA com sémen criopreservado (equino); **B** – Diagnóstico de gestação ao dia 14 pós-ovulação (equino); **C** e **D** – Lavagem uterina para recolha de embriões (equino); **E**, **F** e **G** – Lavagem uterina para recolha de embriões (bovino); **H** – Pesquisa de embriões pós-lavagem uterina (bovino) – 9 embriões e 1 ócito.

Ao longo destes 10 meses de estágio fiz também visitas regulares ao Matadouro do Montijo (Raporal, S.A. – STEC) com os principais objetivos de observar a anatomia do trato reprodutivo bovino e treinar a técnica de palpação nesta espécie, e recolher ovários para protocolos de fertilização *in vitro* (FIV) também em bovino (figura 3).

Figura 3 – Aparelho genital feminino de bovino, recolhido em matadouro.



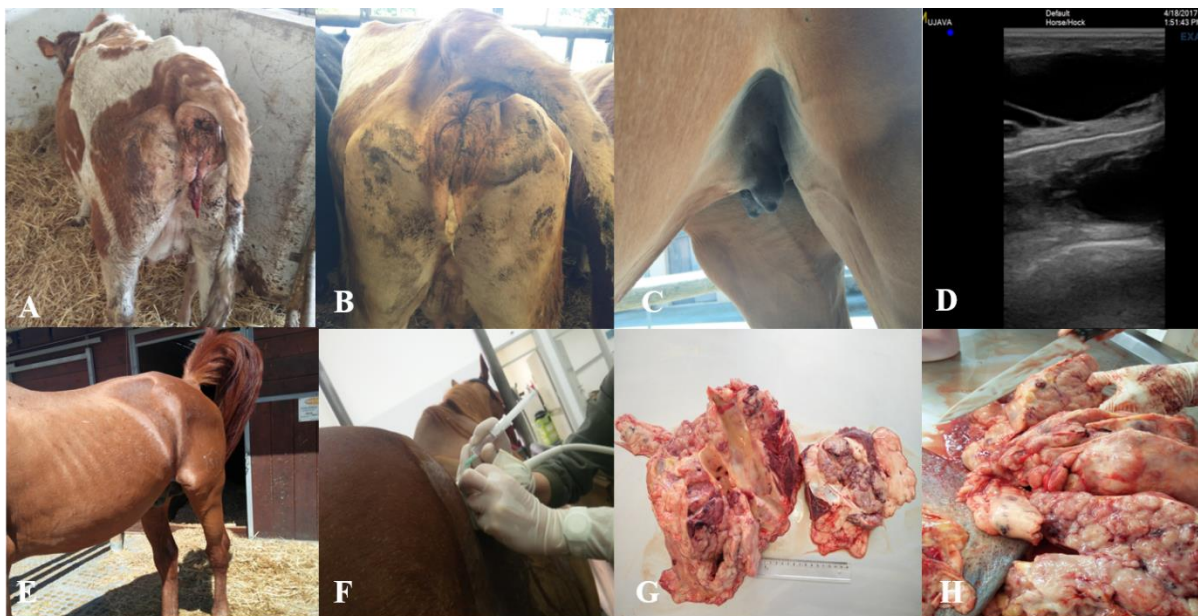
Tive ainda a oportunidade de participar na resolução de alguns casos clínicos (figura 4). Acompanhei um caso de retenção placentária em bovino; um caso de piroplasmose num poldro de 5 semanas; um caso de claudicação em equino; um caso de neoplasia em equino (invasão linfática de tumor testicular); e um caso de patologia da glândula mamária em equino (linfangiectasia). Estes dois últimos casos deram origem a duas comunicações orais apresentadas nas jornadas nacionais do Grupo de Trabalho de Investigação em Equinos, das quais sou co-autora:

Fonseca, R.G.*; Torres, A.C.*; Pinto, M.; Peleteiro, C; Lopes-Da-Costa, L.: Linfangiectasia na glândula mamária numa égua: relatório de caso clinico. V Jornadas do Grupo de Trabalho de Investigação em Equídeos, 8 de Novembro de 2017, Golegã.

Torres, A.C.*; Fonseca, R.G.*; Pinto, M.; Lamas, L.; Pissara, H.; Peleteiro, C.; Lopes-Da-Costa, L.: Neoplasia testicular num equino: relatório de caso clinico. V Jornadas do Grupo de Trabalho de Investigação em Equídeos, 8 de Novembro de 2017, Golegã.

*ambos os autores contribuíram equitativamente para este trabalho.

Figura 4 – Casos clínicos acompanhados durante o estágio.



A – Retenção placentária (bovino); **B** – Metrite desenvolvida após retenção placentária (**A**); **C** – Acumulação anormal de líquido nos tetos (equino); **D** – ultrassonografia dos tetos da égua representada em **C**; **E** – Equino macho com edema ventral; **F** – Punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de uma massa detetada por ultrassonografia na zona dorso-lateral da zona abdominal caudal (equino representado em **E**); **G** e **H** – massas extraídas em necrópsia do equino representado em **E**, correspondentes a linfonodos com infiltração de células neoplásicas

Quanto à área de Investigação Científica, participei em três projetos internos do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) financiados pelos fundos FCT UID/CVT/00276/2013:

- Projeto CIISA 3 – 2015/2016, intitulado “Wnt-PG pathways communication in the murine embryo development and competence” e dirigido pela Professora Doutora Ana Catarina Torres, que deu origem a esta dissertação de mestrado;
- Projeto CIISA 9 – 2016/2017, intitulado “Interplay of Notch pathway ligands Dll4 and Jagged1 in the modulation of mammalian spermatogenesis” e dirigido pelo Doutor Daniel Murta, no qual realizei as técnicas laboratoriais de qRT-PCR e imunohistoquímica em cortes histológicos;
- Projeto CIISA 3 – 2016/2017, intitulado “An *in vitro* tridimensional matrigel culture system to evaluate early maternal communications: role of steroids and prostanoids” e dirigido pela Professora Doutora Ana Catarina Torres, no qual participei em protocolos de fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos.

II. INTRODUÇÃO

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICAÇÃO DO TRABALHO

A implantação é uma etapa crucial para a manutenção da gestação, presumindo-se que cerca de 50% de todas as gestações em humanos resultem em mortalidade embrionária precoce devido a falhas no mecanismo da implantação. Apesar das técnicas de reprodução assistida (TRA) terem ajudado a ultrapassar grande parte das afeções do foro reprodutivo, a implantação continua a ser a etapa limitante nos tratamentos de FIV (Dekel, Gnainsky, Granot, Racicot & Mor, 2014). Embora seja uma temática estudada por múltiplas equipas em todo o mundo e já tenham sido descritas inúmeras vias de sinalização envolvidas no processo de implantação, a interação entre as várias vias e a sua relevância para este processo é ainda pouco conhecida.

A via das prostaglandinas (PGs) é uma das vias de sinalização mais estudadas com influência nos processos de implantação e de espaçamento dos embriões. Sabe-se que a inibição das enzimas envolvidas nesta via resulta em bloqueio ou atraso na implantação ou redução do número de implantações e perturba o mecanismo de espaçamento dos embriões (Kennedy, 1977; Evans & Kennedy, 1978; Wellstead, Bruce & Rahima, 1989).

A via Wnt canónica desempenha um papel importante em vários eventos do desenvolvimento embrionário e na preparação do útero para a receção do embrião (revisto por Chen *et al.*, 2009). Embora os elementos desta via sejam intensamente expressos ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação (Lloyd, Fleming & Collins, 2003; Mohamed, Dufort & Clarke, 2004; Kemp, Willems, Abdo, Lambiv & Leyns, 2005), o embrião consegue desenvolver-se até à fase de blastocisto na ausência da sinalização Wnt (revisto por Sonderegger, Pollheimer & Knöfler, 2010). No entanto, a inibição desta via resulta em falhas no mecanismo de implantação, uma vez que é essencial na ativação do blastocisto (BL) e, por isso, na aquisição de competência do embrião para a implantação (Xie *et al.*, 2008).

No que respeita à interação entre as duas vias descritas anteriormente, há evidências de que esta atua quer em processos fisiológicos, tal como a regeneração de tecidos (Goessling *et al.*, 2009), quer em processos patológicos, como é o caso das neoplasias (Liedert *et al.*, 2010; Oshima & Oshima, 2010). Recentemente, um estudo mostrou que células trofoblásticas humanas tratadas *in vitro* com Dkk1 (*Dickkopf protein 1* - um inibidor da via Wnt canónica) induziram um aumento de produção da prostaglandina E₂ (PGE₂) (Nayeem, Dharmarajan & Keelan, 2015). Esta parece ser a primeira referência de uma interação entre as duas vias, Wnt e PG, em eventos reprodutivos. No entanto, não é claro ainda se a interação existente entre estas duas vias influencia o desenvolvimento do BL e a aquisição de competência para a implantação.

II. INTRODUÇÃO

Desta forma, a hipótese formulada para este trabalho é de que o bloqueio da sinalização canónica da via Wnt pelo Dkk1 irá conduzir a uma alteração da transcrição dos genes que codificam para as prostaglandinas no embrião pré-implantação e/ou nos locais de implantação (LI).

2. OBJETIVOS

Os objetivos estabelecidos para este trabalho experimental foram:

- 1) Avaliar a transcrição de genes associados à via das PGs em diferentes fases do desenvolvimento embrionário pré-implantação em murgancho.
- 2) Avaliar a possibilidade da existência de uma interação entre as vias de sinalização Wnt-PG no desenvolvimento embrionário pré-implantação em murgancho:
 - a) Avaliar se a transcrição de genes associados à via das PGs é alterada em embriões com bloqueio da sinalização Wnt canónica.
 - b) Avaliar se a transcrição de genes associados à via das PGs pelos LI é alterada com o bloqueio da sinalização Wnt canónica nos embriões pré-implantação, na fase da implantação.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DO MURGANHO (*Mus musculus*)

O murganho (*Mus musculus*) é uma espécie polítoca, desenvolvendo-se vários fetos em cada gestação, sendo o número médio da ninhada entre 5 e 6 crias (Bennet & Vickery, 1970).

Como os murganhos são animais notívagos, o estro (correspondente ao período de receptividade sexual ao macho) ocorre maioritariamente durante a noite e tem uma duração aproximada de 14 horas. A ovulação ocorre neste período, cerca de 8 a 11 horas após o início do cio, e o corpo lúteo (CL) atinge o seu tamanho máximo 3 dias depois (Bennet & Vickery, 1970). Contudo, o CL formado após a ovulação só é ativo, no que respeita à produção hormonal, se o cérvix tiver sido previamente estimulado durante o estro. Desta forma, se não houver cópula, a luteólise funcional instala-se de imediato, embora a estrutura lútea permaneça no ovário durante os próximos 3 ciclos éstricos. Neste caso, o período inter-estros representa uma condição de proestro e a sua duração está dependente do tempo necessário à formação de novos folículos pré-ovulatórios (Bennet & Vickery, 1970).

A estimulação da vagina e do cérvix, quer mecanicamente, quer pelo coito, provoca a libertação de prolactina pela adeno-hipófise, que por sua vez vai ativar a produção de progesterona (P_4) pelo CL. Este mantém-se ativo até à altura da placentação, cerca dos 13 dias pós-coito (dpc). Após a cópula, é formado um rolhão vaginal, derivado das secreções das glândulas anexas masculinas, que é visível durante 16 a 48 horas. Se tiver havido estimulação cervical no estro, mas não ocorrer fertilização, a produção de P_4 mantém-se pelo mesmo período de tempo (aproximadamente 13 dias), pelo que se diz que a fêmea está pseudogestante (Bennet & Vickery, 1970). A gestação tem uma duração média de 19 a 21 dias, no entanto pode ser prolongada se a mãe estiver em lactação. Neste caso, e dependendo do número de crias lactantes, o parto seguinte pode ser adiado até 16 dias (Bennet & Vickery, 1970).

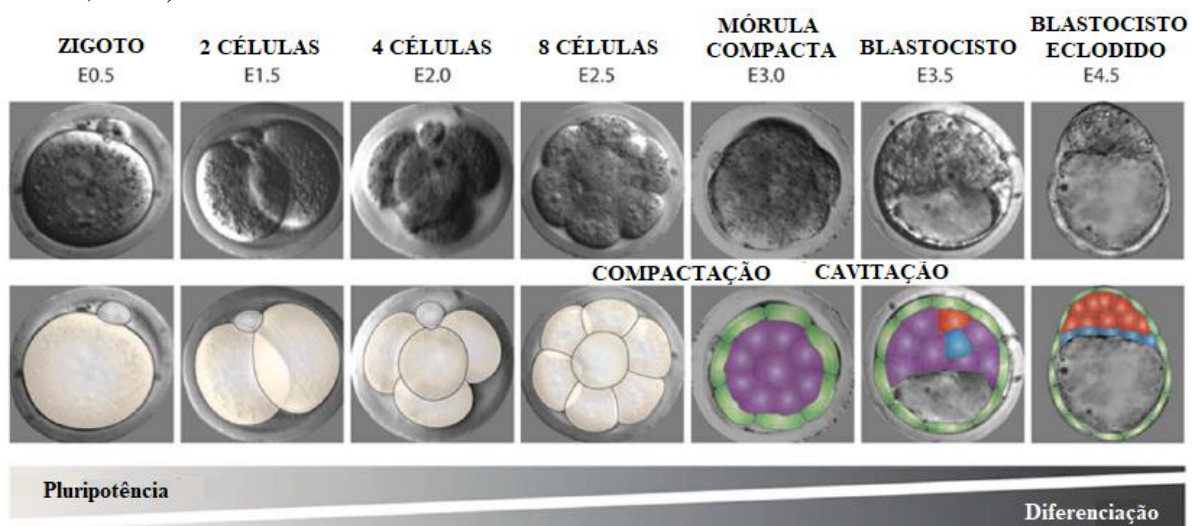
2. DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO MURINO NO PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO

Ao longos dos tempos descreveram-se vários sistemas para a classificação de estádios do desenvolvimento do embrião murino, sendo o mais usado o sistema de Theiler (1989) (Hill, 2017b). Este sistema baseia-se na classificação que Streeter (1942) propôs para o desenvolvimento do embrião humano e permite-nos relacionar as diferentes fases do desenvolvimento pré- e pós-implantação dos embriões murinos com as suas idades gestacionais (revisto por Kaufman, 1999).

O desenvolvimento embrionário pré-implantação é definido como o período temporal compreendido entre a fertilização e a implantação. Segundo Theiler (1989), podemos dividir este período em 6 estádios. O primeiro estádio inicia-se com a fertilização do oócito pelo espermatozoide capacitado na porção mais dilatada do oviduto – a ampola. Este fenómeno desencadeia a conclusão da segunda divisão meiótica do oócito e origina uma célula diplóide – o zigoto. Nesta altura, ainda é possível observar as células do *cumulus oophorus* que rodeavam o oócito. Esta camada celular, originária das células da granulosa do folículo pré-ovulatório, tem um papel importante, tanto na maturação do oócito e na sua condução até ao oviduto, como no processo de fertilização propriamente dito (Tanghe, Soom, Nauwynck, Coryn & De Kruif, 2002). O segundo estádio (Theiler, 1989) caracteriza-se pelo início da segmentação, onde tem lugar a primeira divisão celular, ou clivagem, do embrião. Nesta espécie, a primeira clivagem está completa por volta das 24 horas pós-coito, originando duas células de igual tamanho, também designadas de blastómeros. É também nesta altura que ocorre a ativação do genoma embrionário, ou transição materno-embrionária. Esta é uma das fases mais críticas do desenvolvimento embrionário, pois o embrião deixa de depender exclusivamente da transcrição materna para passar a expressar o seu próprio transcriptoma (Schultz, 2002). Até aqui, o metabolismo embrionário depende essencialmente de piruvato e lactato (Gardner & Leese, 1988) e de alguns ácidos aminados, tais como a glutamina, a cisteína e a glicina (Brinster, 1968), e não da glucose, que pode ser prejudicial nesta fase inicial do seu desenvolvimento (Brown & Whittingham, 1992). No terceiro estádio (Theiler, 1989), os embriões atingem a fase de mórula, e são agora constituídos por 4 a 16 células. Na fase de 8 células, inicia-se o processo de compactação, que é essencial para a diferenciação das linhas celulares que se aproxima. O contorno dos blastómeros deixa de ser nítido devido à grande proximidade entre as células e, consequentemente, o embrião toma uma forma mais esférica, designando-se mórula compacta (MC). Durante este processo há uma alteração do metabolismo embrionário, que é distinto do observado até então, e que passa a permitir a utilização de glucose como substrato energético

(Gardner & Leese, 1988). Após a compactação, dá-se a primeira segregação espacial das células (estadio 4), com a maioria dos blastómeros a posicionarem-se na periferia do embrião. Estas células mais externas transportam iões de sódio (Na^+) e cloro (Cl^-) para o interior do aglomerado celular, promovendo assim a entrada de água por osmose para os espaços intercelulares (Hill, 2017a). A partir deste ponto forma-se uma cavidade – o blastocelo – e o embrião toma a designação de BL - estadio 5 (Theiler, 1989). O BL é formado por uma camada celular mais externa – a trofoectoderme (TE) ou trofoblasto – que dará origem aos anexos embrionários; e pelo botão embrionário ou embrioblasto (ICM – do inglês *inner cell mass*), um aglomerado de células pluripotentes a partir das quais se desenvolverão os tecidos fetais e alguns anexos embrionários (White, Bissiere, Alvarez & Plachta, 2016). À medida que o embrião se desenvolve, as células da ICM vão progressivamente caminhando para um dos polos – o polo embrionário – até que apenas uma pequena porção da vesícula embrionária está ocupada por este grupo celular. Nesta altura o embrião denomina-se blastocisto expandido (BEX). A partir do 4º estadio (Theiler, 1989) os embriões começam a entrar no útero e, posteriormente, eclodem, isto é, deixam de estar envolvidos pela zona pelúcida, tomando a designação de blastocisto eclodido (BCL). O processo de eclosão é muito importante pois permite o crescimento exponencial do embrião e a sua adesão ao epitélio uterino, onde poderá contactar diretamente com as secreções uterinas (Hill, 2017a). Por fim, o sexto estadio (Theiler, 1989) é então marcado pela implantação propriamente dita, que se inicia nesta espécie por volta dos 4,5 dpc.

Figura 5 - Desenvolvimento embrionário no período pré-implantação (adaptado de Schrode *et al.*, 2013)



Legenda: branco – blastómeros totipotentes; verde – trofoectoderme; roxo – botão embrionário

3. IMPLANTAÇÃO

A implantação é uma das fases mais importantes do desenvolvimento embrionário, sendo considerada a etapa limitante dos tratamentos de FIV (Dekel *et al.*, 2014). A sincronia entre o desenvolvimento do embrião até BL e a preparação do endométrio para a implantação é de extrema importância para que este evento ocorra com sucesso. Além disso, estudos em que se transfere um embrião tardiamente para o útero de uma fêmea recetora de embriões, indicam que o BL pode esperar pela fase recetiva do útero, mas o contrário não se verifica; isto é, um endométrio recetivo não prolonga a sua recetividade para que o embrião adquira competência para a implantação (revisto por Yoshinaga, 1988). Este período limitado de tempo é frequentemente designado de “janela” de implantação. Nos roedores, esta janela temporal é muito curta, pelo que é absolutamente essencial que o blastocisto já tenha adquirido competência para a implantação quando o útero atinge o estado de recetividade (revisto por Yoshinaga, 1988).

A aquisição de competência por parte do embrião implica que este se encontre ativo, por oposição a um estado de dormência, também denominado de diapausa, que determina uma implantação atrasada. A diapausa embrionária é, por definição, uma condição de suspensão temporária do desenvolvimento do embrião, devido à supressão da proliferação celular no estadio de BL (revisto por Lopes, Desmarais & Murphy, 2004). Reconhecem-se dois tipos de diapausa embrionária: a diapausa facultativa, descrita nos roedores e marsupiais, que corresponde à suspensão do desenvolvimento embrionário induzida por condições ambientais adversas; pelo contrário, a diapausa obrigatória está presente em todas as gestações de uma determinada espécie, provavelmente como mecanismo de sincronização de partos para uma altura do ano com condições ambientais favoráveis à sobrevivência dessa mesma espécie (revisto por Lopes *et al.*, 2004). No caso dos roedores, quando se verifica este fenómeno, o desenvolvimento do embrião para além do estadio de BL é atrasado até que se desencadeie um pico de estrogénios responsável pela indução da recetividade uterina e, consequentemente, da implantação (revisto por Sutherland, 2003, e por Lopes *et al.*, 2004). A um nível celular, verifica-se cessação ou diminuição extrema da proliferação celular. As células do embrião em diapausa assumem um estado de quiescência, em que é mantido um metabolismo basal, com transcrição e síntese proteica apenas suficiente para evitar a apoptose celular (revisto por Lopes *et al.*, 2004).

O desenvolvimento dos embriões dos mamíferos requer uma fonte externa de nutrientes. No caso dos roedores, e à semelhança do que ocorre em humanos, esta é conseguida pelo estabelecimento de conexões vasculares com a mãe que levam à formação de uma placenta do

tipo hemocorial (revisto por Sutherland, 2003). A formação deste tipo de placenta implica que as células da TE invadam o epitélio uterino de forma a entrarem em contacto íntimo com as células da lâmina própria do endométrio (revisto por Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989).

Após a eclosão, o embrião adere ao epitélio uterino desencadeando o processo de decidualização. Durante este processo, os fibroblastos da lâmina própria uterina transformam-se em células secretoras do tipo epitelióide, designadas por células deciduais (revisto por Salleh, 2014). Estas células formam um tecido transitório, cujas principais funções são de suporte do embrião e de mediar a formação de vasos sanguíneos de origem materna, que providenciam oxigénio e nutrientes ao embrião antes da placentação (Hantak, Bagchi & Bagchi, 2014). No caso dos roedores, e por oposição ao observado no ser humano, este processo é induzido pelo embrião quando este inicia a sua adesão ao epitélio uterino; nas mulheres, a decidualização uterina é independente da presença do embrião, ocorrendo naturalmente na fase secretória de cada ciclo menstrual (Ramathal, Bagchi, Taylor & Bagchi, 2010).

A implantação pode ser dividida em 3 fases: aposição, adesão e invasão. Na primeira fase, as células da TE entram em contacto com o epitélio luminal do útero. Posteriormente, dá-se o encerramento do lúmen seguido de uma forte adesão da TE ao endométrio, que coincide com um aumento da permeabilidade vascular local. Por fim, o embrião inicia a invasão do epitélio luminal uterino (revisto por Zhang *et al.*, 2013). A erosão do epitélio uterino inicia-se ao nível da zona equatorial do embrião e as células da TE adjacentes transformam-se em células trofoblásticas gigantes (Theiler, 1989), que apresentam uma intensa atividade fagocítica e de invasão (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989). Além disso, após a adesão ao epitélio uterino, as células epiteliais que rodeiam o BL sofrem um processo de apoptose de forma a facilitar a invasão do embrião e o seu acesso à rede vascular materna (revisto por Zhang *et al.*, 2013).

O sucesso da gestação depende em grande parte de uma comunicação complexa e favorável entre os tecidos maternos e o embrião/feto. A implantação é uma fase decisiva e limitante do desenvolvimento embrionário, sendo marcada por algumas interações embrio-maternas importantes, nomeadamente o estabelecimento de extensas áreas de contacto entre o embrião e o endométrio no polo abembrionário e nas paredes laterais do embrião; a desorganização gradual das células deciduais mais internas no lado anti-mesometrial; e o aumento da atividade fagocítica do trofoblasto devido à difusão das células trofoblásticas gigantes ao longo da periferia do embrião (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989).

4. TÉCNICAS DE RECOLHA, TRANSFERÊNCIA E AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES

4.1. Recolha De Embriões Em Murganho

Quando se pretende fazer estudos com oócitos, estes podem ser obtidos por aspiração com agulha fina do líquido folicular do folículo pré-ovulatório. Quando se trata de obter oócitos fertilizados (zigotos ou embriões mais desenvolvidos), é necessário recolhê-los a partir do oviduto ou do útero (Bennet & Vickery, 1970). É ainda importante referir que qualquer um destes procedimentos implica a realização prévia da eutanásia das fêmeas, uma vez que é necessário retirar parte ou mesmo a totalidade do aparelho genital.

Embora não seja estritamente necessário, a utilização de protocolos de superovulação previamente à recolha com gonodotrofinas, nomeadamente com eCG (gonadotrofina coriônica equina) e hCG (gonadotrofina coriônica humana), é frequente e tem como objetivo aumentar do número de oócitos fertilizados recolhidos (Bennet & Vickery, 1970). A escolha do protocolo de superovulação a utilizar depende de vários fatores, nomeadamente da estirpe e peso dos animais a serem superovulados, uma vez que estes fatores podem afetar a resposta ao tratamento (revisto por Luo *et al.*, 2011).

Estão descritas várias técnicas para a recolha dos embriões a partir do oviduto. Uma delas implica isolar todas as estruturas na proximidade da bursa ovárica, começando por se fazer a secção do útero caudalmente à junção útero-tubárica; de seguida realiza-se a disseção cuidadosa do ovário de modo a conseguir-se introduzir uma agulha na porção inicial do infundíbulo, junto às fimbrias. Alternativamente, a agulha pode ser inserida na junção útero-tubárica, sendo feita a lavagem a partir desse ponto. Para se recolher os embriões a partir do útero, este deve ser totalmente removido e de seguida a lavagem é realizada entre a junção útero-tubárica e o cérvix (Bennet & Vickery, 1970).

Na prática, as duas técnicas podem ser combinadas. Será fácil entender que quanto mais precoce é o embrião que se pretende obter, mais vantagens há em recorrer à primeira técnica. Assim, tendo em consideração que em média os embriões entram no útero no estadio de MC ou de BL (Theiler, 1989), a recolha a partir do oviduto terá como objetivo selecionar os embriões mais precoces, como os zigotos e as mórulas. Da mesma forma, quanto mais deixarmos avançar a gestação, mais desenvolvidos serão os embriões e maior será a probabilidade de os conseguirmos recolher a partir do útero. No entanto, uma vez que os embriões não entram no útero todos em simultâneo, nem no mesmo estadio de desenvolvimento, e que por norma o objetivo destes estudos é fazer a comparação entre os vários estadios, há um claro benefício em fazer a lavagem de ambas as estruturas.

4.2. Transferência De Embriões Em Murganho

As fêmeas recetoras de embriões devem estar num estado de pseudogestação para receber o embrião, pois só desta forma terão um CL ativo. Assim, estas fêmeas são colocadas com machos vasectomizados, de forma a que a cópula estimule o cérvix sem que ocorra fertilização. Antes de se realizar a transferência, deve-se atender à sincronização entre dadora e recetoras de embriões. Como já foi referido anteriormente, é necessário que o embrião já tenha atingido competência para a implantação quando o útero atinge a sua fase recetiva. Desta forma, os embriões a transferir devem estar em completa sincronia ou até 2 dias mais adiantados relativamente ao útero para o qual serão transferidos (Bennet & Vickery, 1970).

A transferência de embriões em murganho pode ser realizada tanto por procedimentos cirúrgicos como não cirúrgicos. Apesar de o primeiro tipo ser tradicionalmente mais usado, hoje em dia têm vindo a ser otimizados procedimentos não cirúrgicos por forma a poderem substituir os métodos cirúrgicos de maneira a obter a mesma taxa de sucesso, com uma melhoria significativa do bem-estar animal (Cui *et al.*, 2014). Ambos os tipos de metodologias implicam a realização de uma anestesia geral dos animais.

O método cirúrgico de transferência é o atualmente usado no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento da FMV-UL. Após a anestesia geral do animal, um dos cornos uterinos é aberto através de uma pequena incisão do lado anti-mesometrial; de seguida, os embriões são colocados no lúmen uterino, com o cuidado de não se injetar ar; repete-se a técnica para o corno uterino contra-lateral; por fim, sutura-se o peritoneu e a parede abdominal (Nagy, 2003).

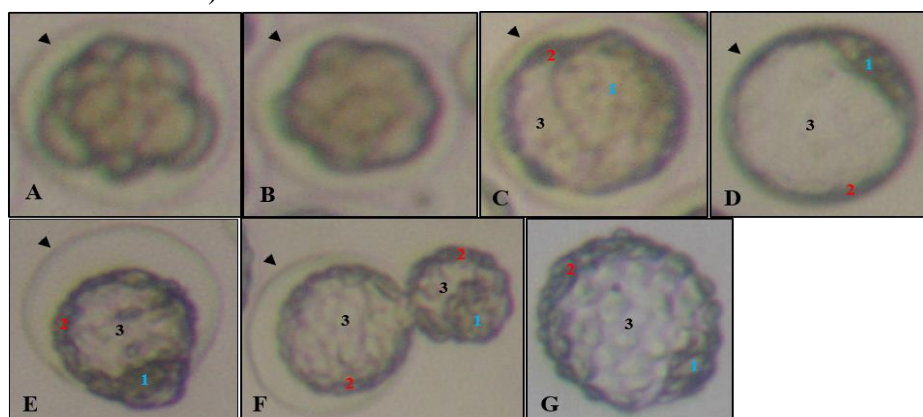
4.3. Avaliação Dos Embriões

Desde os primórdios das TRA em mamíferos que se sabe que a qualidade do embrião influencia o sucesso da gestação pós-transferência de embriões. Isto é, um embrião de qualidade superior terá maior probabilidade de chegar a termo, quando comparado com um embrião de qualidade inferior (revisto por Rocha *et al.*, 2016). Contudo, os métodos utilizados atualmente para avaliar a qualidade dos embriões continuam a ser muito subjetivos devido à baixa repetibilidade, havendo discrepância na avaliação efetuada por diferentes operadores. Desta forma, o desenvolvimento de novos métodos de avaliação da qualidade dos embriões, que sejam mais objetivos e não-invasivos começa a tornar-se fundamental. Apesar da vasta investigação nesta área, a implementação de novos métodos não tem sido possível, por terem custos elevados e/ou serem invasivos, ou até mesmo letais para os embriões. Assim, e apesar da sua subjetividade, a

análise visual da morfologia dos embriões continua a ser a técnica mais usada (revisto por Rocha *et al.*, 2016). Na ausência de um consenso da comunidade científica perante os parâmetros específicos a avaliar nos embriões de murganho, recorre-se muitas vezes ao que já está estabelecido para outras espécies em que a manipulação de embriões é usada com fins comerciais, como é o caso dos humanos e dos bovinos. Assim, podemos guiar-nos pelo que foi estabelecido pela IETS (Internacional Embryo Transfer Society) para a classificação morfológica de embriões de bovino. Segundo Mapletoft (2006), a primeira coisa a fazer após a cultura dos embriões é classificá-los, determinando-se o estadio de desenvolvimento (mórula, MC, jovem BL, BL, BEX ou BCL) e o grau de qualidade, de acordo com a avaliação morfológica (grau 1 a 4, sendo grau 1 qualidade excelente e grau 4 qualidade medíocre). O embrião ideal deve ser compacto e esférico; os blastómeros devem ser de tamanho semelhante, com coloração e textura homogêneas; o citoplasma deve ser regular e não vesiculado; o espaço perivitelino deve ser claro, sem detritos celulares; a zona pelúcida deve ser uniforme, sem estar partida ou colapsada, e não deve conter detritos à sua superfície. Na figura 6 estão representados embriões classificados como grau 1, em diferentes fases do desenvolvimento embrionário.

Para a realização de transferência de embriões, devem ser selecionados preferencialmente embriões de qualidade excelente ou boa (grau 1 ou 2) e nos estadios de MC ou BL, pois serão aqueles que terão maior probabilidade de prosseguir com a gestação (Mapletoft, 2006).

Figura 6 – Embriões de ratinho de grau 1 em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (imagens gentilmente cedidas pela equipa de investigação da Secção de Reprodução e Obstetrícia da FMV-UL).

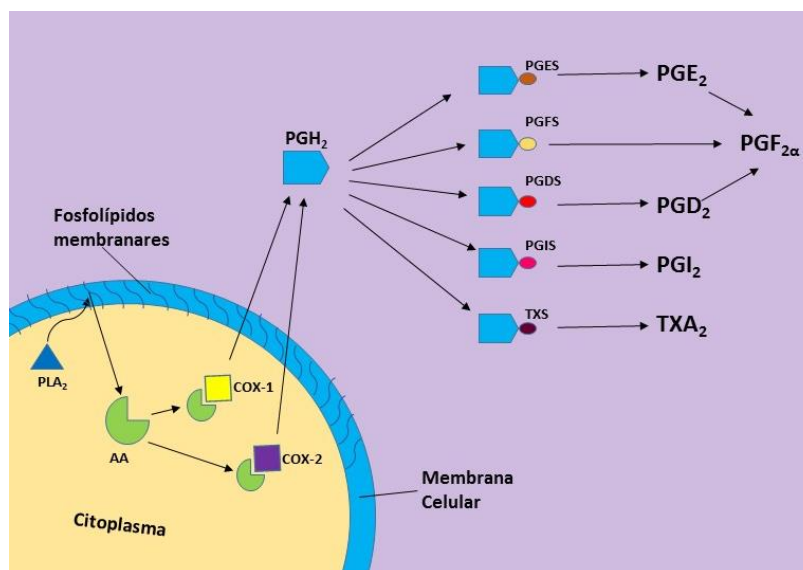


A - estadio de mórula (ainda se distinguem os limites celulares – antes da compactação). **B** – mórula compacta (os limites celulares dos blastómeros externos deixaram de ser nítidos). **C** – blastocisto. **D** – blastocisto expandido. **E** – estadio de blastocisto eclodido - fase inicial de eclosão (notar a rotura da zona pelúcida junto ao polo do botão embrionário). **F**: blastocisto meio eclodido. **G**: blastocisto totalmente eclodido (notar o desaparecimento da zona pelúcida). **Legenda**: cabeça da seta aponta para a zona pelúcida; **1**: botão embrionário; **2**: trofoectoderme; **3**: blastocelo

5. VIA DAS PROSTAGLANDINAS

As PGs são sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA) existente nos fosfolípidos membranares das células. Devido à ubiquidade do seu precursor, as PGs podem ser produzidas por praticamente todas as células do organismo e estão por isso implicadas em diversos processos celulares (Hertelendy & Zakár, 2004). A sua síntese pode ser dividida em três etapas principais (Lindstrom & Bennett, 2004): i) mobilização do AA a partir das membranas celulares por ação de fosfolipases, nomeadamente a fosfolipase A₂ (PLA₂); ii) conversão do AA livre em prostaglandina H₂ (PGH₂), um intermediário instável, por ação de ciclo-oxigenases (COX); iii) conversão da PGH₂ nos principais prostanóides produzidos *in vivo* - PGE₂ (prostaglandina E₂), PGF_{2α} (prostaglandina F_{2α}), PGI₂ (prostaciclina), PGD₂ (prostaglandina D₂) e TXA₂ (tromboxano) - numa reação catalisada por várias sintases terminais. Estas últimas incluem a PGES (*prostaglandin E₂ synthase*), PGFS (*prostaglandin F synthase*), PGIS (*PGI₂ synthase*), PGDS (*PGD₂ synthase*) e TXS (tromboxano sintase), respetivamente. Em relação à síntese da PGF_{2α}, estão descritas três vias: diretamente a partir da PGH₂, à semelhança das restantes PGs; ou por redução da PGE₂ ou da PGD₂ (revisto por Watanabe, 2002).

Figura 7 - Esquema ilustrativo da síntese de prostaglandinas.



5.1. COX

As COXs (anteriormente designadas de PGH sintases) intervêm numa etapa limitante da produção de prostanóides, catalisando a conversão do AA para o intermediário instável, PGH₂, e são o alvo da terapêutica por anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (revisto por Schwab, Schluesener, Meyermann & Serhan, 2003). Estão descritas duas isoformas desta enzima –

COX-1 e COX-2 – que, apesar de possuírem propriedades enzimáticas semelhantes, são reguladas de forma distinta (Lindstrom & Bennett, 2004). A COX-1 é uma enzima de expressão constitutiva na maioria das células, sendo a maior fonte de prostanóides com função na regulação da homeostase (Ricciotti & FitzGerald, 2011). A COX-2, por outro lado, é uma enzima que, em condições fisiológicas, não é detetável na maioria dos tecidos; a sua expressão é induzida por estímulos inflamatórios, hormonas e fatores de crescimento, sendo assim a principal fonte de prostanóides na inflamação e doenças proliferativas, como é o caso das neoplasias malignas (Lindstrom & Bennett, 2004; Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Quanto ao papel destas enzimas no sistema reprodutor, vários autores sugerem a sua importância na fisiologia reprodutiva da fêmea (Lim *et al.*, 1997), no parto (revisto por Lindstrom & Bennett, 2004) e no desenvolvimento embrionário (Tan, Liu, Diao & Yang, 2005), nomeadamente na eclosão (Huang, Wun, Goldsby, Matijevic-Aleksic & Wu, 2004; Roy & Seshagiri, 2013) e na implantação dos embriões (Lim *et al.*, 1999).

5.2. PG Sintases

5.2.1. PGES

A PGES é uma sintase terminal que catalisa a conversão da PGH_2 em PGE_2 . Até ao momento, estão descritos para este grupo dois tipos de sintases: uma PGES citosólica (cPGES) e outra associada à membrana (mPGES). A primeira apresenta uma expressão constitutiva e converte preferencialmente a PGH_2 derivada da COX-1 em PGE_2 , pelo que está normalmente associada a processos envolvidos na manutenção da homeostase (revisto por Helliwell, Adams & Mitchell, 2004). Relativamente à mPGES, são conhecidas duas isoformas: mPGES-1 que, ao contrário da cPGES, se associa preferencialmente à COX-2 e, por isso, a sua expressão é também induzida por estímulos inflamatórios (revisto por Helliwell *et al.*, 2004); e mPGES-2, a PGES mais recentemente caracterizada (Tanikawa *et al.*, 2002), de expressão constitutiva em variados tecidos e que se associa a ambas as COX para a produção de PGE_2 (Ricciotti & FitzGerald, 2011). A PGE_2 desempenha um papel importante na fertilização. Nos momentos que antecedem a ovulação, é libertada uma grande quantidade desta PG no folículo pré-ovulatório por ação da COX-2 e, após a ovulação, esta intervém na dissolução da matriz extracelular produzida pelas células do *cumulus*, que é necessária para que a fertilização ocorra com sucesso (revisto por Sugimoto, Inazumi & Tsuchiya, 2015).

5.2.2. PGIS

A PGIS é a sintase terminal envolvida na produção de PGI_2 , que é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária (Helliwell *et al.*, 2004). Nas células endoteliais, a PGIS é expressa de forma constitutiva e associa-se à COX-1. No entanto, estudos feitos em murganhos e humanos mostram que a COX-2 é a fonte maioritária de prostaciclina (revisto por Ricciotti & FitzGerald, 2011). Para além das funções já mencionadas, a PGI_2 é também responsável pelo relaxamento do músculo liso e é a PG produzida em maior quantidade pelo miométrio humano (revisto por Helliwell *et al.*, 2004). O relaxamento muscular do útero induzido pela prostaciclina parece ser importante nos mecanismos de implantação e manutenção da gestação. Com o aproximar do termo da gestação, verifica-se um aumento desta PG, que pode estar implicado na maturação cervical necessária para que o parto ocorra naturalmente (revisto por Hertelendy & Zakár, 2004).

5.2.3. PGFS

A PGFS é a sintase terminal envolvida na produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta PG desempenha funções importantes em vários sistemas orgânicos, nomeadamente no rim, nos vasos, no miocárdio e no sistema nervoso central (revisto por Ricciotti & FitzGerald, 2011). No que respeita ao sistema reprodutor, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ está envolvida no mecanismo de indução da luteólise no ciclo éstrico e no parto (revisto por Sugimoto *et al.*, 2015). A maioria das PGFSs pertencem à superfamília das aldo-ceto-redutases (AKRs) (Watanabe, 2002), que, até ao momento, tem descritas 15 famílias diferentes, designadas de AKR1 a AKR15 (revisto por Mindnich & Penning, 2009). A atividade PGFS das AKRs já foi detetada no sistema reprodutivo em várias espécies de mamíferos: em humanos - AKR1A1 e AKR1B1 (Pépin, Chapdelaine & Fortier, 2013), em bovinos - AKR1B5 (Madore *et al.*, 2003), AKR1C7 e AKR1C11 (Perelman School of Medicine – University of Pennsylvania, 2017) e em murganho – AKR1B3 e AKR1B7 (Kabututu *et al.*, 2009).

5.3. PGs No Embrião E No Endométrio Até À Implantação

As PGs parecem intervir em processos fisiológicos importantes do embrião e do útero, que conduzem à implantação do embrião com sucesso (revisto por Marshburn, Shabanowitz & Clark, 1990).

Estes mediadores químicos já foram associados a diversos eventos do desenvolvimento embrionário, como a eclosão do blastocisto, a expansão do trofoblasto e a implantação do embrião (Baskar *et al.*, 1981; Chan, 1991; Ni, Sun, Ding, Ma & Yang, 2002).

Exames imunohistoquímicos demonstraram que a expressão de COX é maior no estádio de MC, sendo significativamente mais baixa após a implantação (Parr, Parr, Munaretto, Clark & Dey, 1988; Marshburn *et al.*, 1990; van der Weiden, Wisse, Helmerhorst, Keirse & Poelmann, 1996). Mais tarde, outros autores estudaram a expressão das diferentes PGE sintases pelo embrião murino (Tan *et al.*, 2005) ao longo de diferentes fases do seu desenvolvimento, desde o zigoto até ao BL. Os resultados do estudo de Tan *et al.* (2005) demonstram um padrão crescente de expressão destas sintases, sugerindo que a síntese de PGE₂ será máxima no estádio de BL, independentemente de ser sintetizada por via COX-1 ou COX-2. Em 2007, Pakrasi e Jain estudaram o efeito de inibidores seletivos de COX-1, COX-2 e PGIS no desenvolvimento do embrião no período pré-implantação. Os seus resultados mostraram que os dois últimos reduziam significativamente o desenvolvimento embrionário, e que a adição de um análogo da PGI₂ ao meio de cultura restabelecia o desenvolvimento dos embriões.

Relativamente ao processo de eclosão, como já foi referido anteriormente, este é um evento de elevada importância que antecede a implantação. Entre outros potenciais reguladores da eclosão do BL nos mamíferos, vários autores destacam as PGs derivadas da COX-2 como sendo potenciais moduladores do desenvolvimento peri-eclosão do embrião murino (Chan, 1991; Huang *et al.*, 2004, 2007; Tan *et al.*, 2005; Pakrasi & Jain, 2007; Kang, *et al.*, 2011). Em 2013, Roy e Seshagiri estudaram a expressão de ARNm e proteína de COX-2 em embriões de hamster desde o estádio de 8 células até ao BCL e ainda a influência de inibidores seletivos de COX-2 no evento da eclosão. Estes autores demonstraram que existia expressão de ARNm e proteína de COX-2 em todos os estádios estudados e que a introdução de AINESs no meio de cultura dos embriões inibia o processo da eclosão de uma forma dependente da dose. Resultados deste estudo mostraram ainda que, ao suplementar o meio de cultura dos embriões tratados com PGE₂ e um análogo da PGI₂, era possível reverter o acontecimento anterior e assim permitir a eclosão dos embriões.

Quanto à implantação, o primeiro relato do possível envolvimento das PGs neste evento remonta à década de 1970, quando Horan (1971) descreveu os efeitos de um AINE nesta fase do desenvolvimento embrionário, mesmo antes de se estabelecer que estes fármacos inibiam a síntese de PGs (revisto por Kennedy, Gillio-Meina & Phang, 2007). Em 1977, Kennedy demonstrou que a implantação era atrasada em ratos tratados com indometacina (um antagonista das PGs). Em 1978, Evans e Kennedy, verificaram que o tratamento com indometacina em hamsters aumentava ligeiramente a mortalidade fetal e o tempo gestacional,

este último indicativo de um fenómeno de implantação atrasada. Além disso, estes autores observaram ainda que o tratamento era responsável pela diminuição do peso dos LI. Dois anos mais tarde, Holmes e Gordashko (1980) confirmaram o bloqueio da implantação em animais tratados com indometacina (facto também observado por Biggers, Baskar e Torchiana em 1981), provavelmente como consequência da não ativação do BL, que é necessária para que o evento da implantação seja desencadeado. Estes autores testaram ainda o efeito da administração de PGs exógenas, nomeadamente PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, na indução da implantação e concluíram que ambas têm um papel importante para o desencadeamento deste evento, embora a PGE_2 tenha sido considerada a mais eficiente.

Outra evidência da importância destes mediadores neste período crítico do desenvolvimento embrionário é o aumento da concentração das PGs associado ao aumento da permeabilidade vascular do endométrio nos locais de implantação (revisto por Kennedy *et al.*, 2007).

Mais tarde, estabeleceu-se que as PGs derivadas da COX-2 seriam mediadores limitantes no processo da implantação, visto que ratinhos *knock-out* para COX-2 são inférteis, com alteração dos mecanismos de ovulação, fertilização, decidualização e implantação (Lim *et al.*, 1997). Por outro lado, ensaios com ratinhos *knock-out* para COX-1 mostram que estes têm fertilidade normal sem alteração significativa do tamanho da ninhada. Pensa-se que as PGs derivadas desta enzima desempenhem o seu papel ao nível da diferenciação e proliferação celular, preparando o útero para o momento da implantação, uma vez que se observa a expressão uterina de COX-1, e não de COX-2, nos dois dias que antecedem este evento (revisto por Reese, Brown, Paria, Morrow & Dey, 1999).

Desde então, vários autores têm descrito a expressão das enzimas envolvidas na cascata das PGs, nomeadamente, COX-1 e -2, cPGES, mPGES-1 e -2 e PGIS, nos LI de murganho, rato e Homem (revisto por Salleh, 2014).

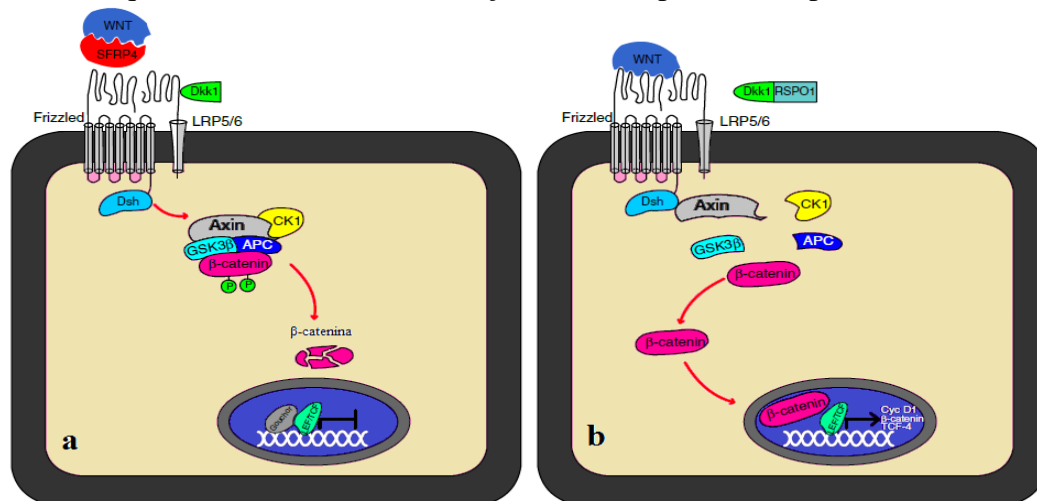
6. VIA WNT

A via Wnt é composta por ligandos, recetores *frizzled* (FZD) e co-recetores LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*). Após a ligação do ligando aos recetores FZD e co-recetores LRP, a sinalização Wnt pode atuar de diferentes formas: através da via canónica (Wnt/ β -catenina) ou por vias não canónicas, nomeadamente as vias Wnt/ Ca^{2+} e PCP (*planar cell polarity*) (revisto por Tepekoy, Akkoyunlu & Demir, 2015).

O maior participante da via Wnt canónica é a β -catenina que se encontra no citoplasma das células associada a um complexo de destruição, sendo ativada ou degradada consoante a sinalização Wnt se encontra ativa ou não, respetivamente. No seu estado ativo, um ligando interage com um complexo recetor FZD/co-recetor LRP, impedindo a degradação da β -catenina, que pode assim deslocar-se ao núcleo da célula de forma a regular a transcrição dos genes associados à via Wnt (revisto por Tepekoy *et al.*, 2015, figura 8).

A regulação desta via de sinalização é feita através de dois tipos de antagonistas: sFRP (do inglês, *secreted FZD related proteins*) e Dkk. Os primeiros são estruturalmente semelhantes aos recetores FZD, pelo que impedem a ligação dos ligandos a estes recetores; os segundos conduzem a uma internalização dos co-recetores LRP-5/6, o que impede a formação do complexo ligando/FZD/LRP. Apesar de atuarem por diferentes mecanismos, ambos os antagonistas levam à inibição da ativação da via Wnt canónica (revisto por Rao & Kühl, 2010 e Tepekoy *et al.*, 2015).

Figura 8 - Esquema ilustrativo da sinalização Wnt (adaptado de Tapekov *et al.*, 2015)



a - Estado Inativo: sFRP ou DKK ligam-se ao ligando ou ao co-recetor LRP, respetivamente, e o complexo de destruição é ativado; consequentemente a β -catenina é destruída.

b – Estado Ativo: um ligando liga-se ao complexo recetor FZD/co-recetor LRP, inibindo o complexo de destruição e permitindo assim que a β -catenina se desloque até ao núcleo para regular a transcrição dos genes associados à via Wnt.

Relativamente aos inibidores da via Wnt canónica, o Dkk1 é um dos que se encontra melhor caracterizado e é, ele próprio, um gene alvo desta via, estando assim envolvido num mecanismo de *feedback* negativo (Li *et al.*, 2010). Além disso, a família Dkk é uma família de proteínas conservada em todos os vertebrados e alguns invertebrados (Rao & Küll, 2010). Como já foi referido anteriormente, esta família, e, portanto, o Dkk1, é responsável pela internalização dos co-recetores LRP5/6, impedindo assim a formação do complexo ligando/recetor FZD/co-recetor LRP. Esta internalização do LRP 5/6 é, não só um mecanismo inibidor da sinalização Wnt canónica, mas também um mecanismo necessário à ativação desta mesma via (revisto por Rao & Küll, 2010). Isto é, o Dkk1 induz uma internalização do co-recetor LRP por uma via endocitótica diferente daquela que se verifica para a ativação da via e, consequentemente, o co-recetor é removido da superfície celular, ficando assim indisponível para a formação do complexo ligando/recetor FZD/co-recetor LRP (Yamamoto, Sakane, Yamamoto, Michiue & Kikuchi, 2008).

6.1. Sinalização Wnt/B-Catenina Nos Eventos Peri-Implantação

A via Wnt canónica desempenha um papel importante em vários eventos do desenvolvimento embrionário, como a embriogénese, a organogénese e a implantação, e na preparação do útero para a receção do embrião (revisto por Chen *et al.*, 2009).

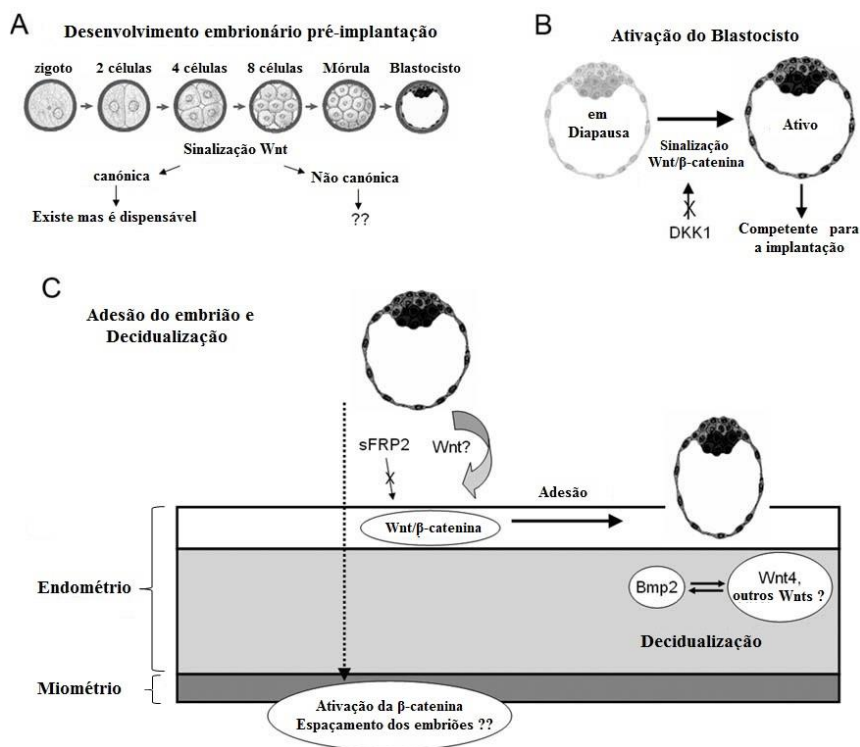
Relativamente ao desenvolvimento embrionário, já vários autores referem a expressão de diversos ligandos, recetores e reguladores associados a esta via pelo embrião no período pré-implantação (Lloyd *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2004; Kemp *et al.*, 2005). A ideia de que esta via é essencial para o desenvolvimento do embrião até BL já foi refutada diversas vezes, usando-se diferentes modelos experimentais (revisto por Sonderegger *et al.*, 2010), no entanto, a sinalização Wnt canónica demonstra-se ser essencial na ativação do BL e, por isso, na aquisição de competência do embrião para a implantação (Xie *et al.*, 2008). Assim, o bloqueio da via Wnt/ β -catenina no embrião parece não influenciar negativamente o desenvolvimento embrionário propriamente dito, mas parece impedir a ativação do BL e assim afetar negativamente a implantação.

No que respeita ao útero, a sinalização Wnt/ β -catenina é detetada transitoriamente na manhã do 4º dpc no miométrio, dando origem a implantações igualmente espaçadas ao longo de toda a extensão dos cornos uterinos e até ao cérvix (Mohamed *et al.*, 2005), suportando a ideia de que esta via pode estar envolvida no mecanismo de espaçamento dos embriões (Chen *et al.*, 2009). Este padrão de ativação da via Wnt canónica, que se observa durante apenas cerca de 24 horas,

está dependente da presença do embrião e é necessário para que a implantação ocorra com sucesso (Mohamed *et al.*, 2005).

O papel desta via também foi identificado no mecanismo de decidualização, tanto em ratinhos como em humanos (Tepekoy *et al.*, 2015). Para além de já ter sido demonstrada a expressão de vários ligandos e genes relacionados com esta via no estroma uterino durante o processo de decidualização, a ausência ou a inatividade de β -catenina nesta altura é responsável por alterações neste processo (Chen *et al.*, 2009). Curiosamente, tanto os ligandos como os inibidores desta via podem desempenhar um papel na indução da decidualização, o que pode significar que existem alguns ligandos com efeito inibidor neste processo que são, por sua vez, inibidos pelos antagonistas da via Wnt, conduzindo em última instância ao desencadear normal do processo de decidualização (Tepekoy *et al.*, 2015).

Figura 9 - Via Wnt nos eventos peri-implantação (adaptado de Chen *et al.*, 2009)



A) O desenvolvimento embrionário, desde a fase de zigoto até blastocisto, envolve a expressão de vários ligandos, recetores e reguladores associados à via Wnt canónica, no entanto também pode decorrer na ausência da sinalização Wnt. **B)** A ativação do blastocisto é uma etapa essencial para que a implantação ocorra com sucesso; a sinalização Wnt canónica demonstra-se ser essencial na ativação do blastocisto e, por isso, na aquisição de competência do embrião para a implantação. **C)** a sinalização Wnt/ β -catenina é necessária na interação embrião-utero que despoleta a implantação. Além disso, esta via está também envolvida na decidualização que ocorre em resposta à adesão do embrião ao epitélio uterino. O possível envolvimento desta via no espaçamento dos embriões está ainda por esclarecer.

7. INTERAÇÃO ENTRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT-PG

Uma vez que estas duas vias de sinalização participam, conjuntamente, em muitos mecanismos biológicos, vários autores tentam perceber se existe uma interação entre ambas as vias e quais as consequências da mesma ao nível do processo biológico em estudo.

Um destes mecanismos é o do desenvolvimento das células estaminais e da regeneração celular. Nesta especialidade científica, um estudo demonstrou que as prostaglandinas são necessárias para a ativação da via Wnt, que por sua vez é responsável pela renovação das células estaminais hematopoiéticas e pelo repovoamento da medula óssea, sugerindo assim que a interação entre estas duas vias pode regular o mecanismo de regeneração celular (Goessling *et al.*, 2009). Esta interação foi ainda referenciada num outro estudo com células estaminais embrionárias humanas (Jones *et al.*, 2010).

A interação Wnt-PG também já foi estabelecida em processos tumorais. Um exemplo é o caso dos tumores do cólon e do recto em que ambas as vias de sinalização, Wnt e PG (através da cascata da COX-2) estão ativas (revisto por Buchanan & DuBois, 2006). Vários estudos sugerem a interação entre as duas vias nesta área, demonstrando a regulação da transcrição de COX-2 pela via Wnt, a relação entre os papéis pro-oncogénico da via COX-2/PGE₂ e oncogénico da via Wnt e a interação entre as duas vias na proteção contra a apoptose das células neoplásicas (Araki *et al.*, 2003; Wang, Mann & DuBois, 2004; Shao, Jung, Liu & Sheng, 2005). Ainda no que diz respeito ao trato gastrointestinal, sabe-se que a indução simultânea de ambas as vias é responsável pelo desenvolvimento de alguns tumores gástricos (Oshima & Oshima, 2010). À semelhança do que se verificou para o carcinoma do cólon e do recto, também nos tumores gástricos a transcrição de COX-2 parece ser regulada por alguns componentes da via Wnt/ β -catenina (Nuñez, Bravo, Cruzat, Montecino & De Ferrari, 2011). Outro exemplo da interação Wnt-PG em processos tumorais é o caso das neoplasias prostáticas com metástases ósseas. As duas vias desempenham papéis importantes no desenvolvimento e remodelação óssea, bem como em doenças como a osteoporose e metástases ósseas de neoplasias prostáticas (revisto por Liu *et al.*, 2010). Nesta área, verificou-se que a via COX-2/PGE₂ regula a ativação da via Wnt, de forma dose-dependente. Isto é, doses baixas de PGE₂ induzem a ativação da sinalização Wnt pelo aumento da expressão dos co-recetores LRP 5/6, enquanto que níveis mais elevados desta PG inibem a via Wnt, quer por inibição da expressão de LRP 5/6, quer pelo aumento da expressão dos inibidores Dkk-1 e sFRP-1 (Liu *et al.*, 2010).

No que concerne ao desenvolvimento embrionário, a interação Wnt-PG foi descrita recentemente pela primeira vez. Um estudo que recorreu a um método de co-cultura com células trofoblásticas humanas e células deciduais demonstrou que o bloqueio da via Wnt canónica,

quer por sFRP4 quer por Dkk1, conduziu ao aumento da produção de PGE_2 , mediada por um aumento da expressão de COX-1, por parte das células trofoblásticas (Nayeem *et al.*, 2015). Estes autores sugerem assim que a interação entre estas duas vias de sinalização possa regular o processo de placentação.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. DESENHO EXPERIMENTAL

1.1. Obtenção e caracterização da amostra

Os embriões e úteros de murganho utilizados neste trabalho experimental foram obtidos a partir de um outro projeto que decorria no laboratório de Reprodução e Desenvolvimento da FMV-UL. A equipa envolvida nesse trabalho recolheu e fez a avaliação dos embriões e otimizou o protocolo de cultura dos mesmos.

Embriões com 2,5 dpc foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: controlo, Dkk1 (inibidor da via WNT canónica), DAPT (inibidor da via Notch) e Dkk1+DAPT. De seguida, os embriões foram colocados em cultura *in vitro* em meio KSOM (MR-020P, Millipore, Specialty Media, Alemanha) suplementado ou não com os inibidores durante 46 horas, até os embriões atingirem os 4,5dpc de idade, tendo sido realizada uma avaliação no que respeita ao estadio de desenvolvimento e qualidade morfológica às 24, 32 e 46 horas de cultura. Parte dos embriões foi processada para extração de ARN (ácido ribonucleico) e avaliação de transcrição de genes relevantes após as primeiras 24 horas de cultura, parte ficaram em cultura até às 32 horas a fim de serem transferidos para fêmeas recetoras de embriões e os restantes ficaram em cultura até às 46 horas para avaliação morfológica e avaliação de transcrição de genes relevantes.

Nas fêmeas recetoras, 48 horas após a transferência dos embriões (5 dias de gestação), procedeu-se à injeção endovenosa de corante azul de Evans (para identificação dos LI), sob anestesia geral, seguida de eutanásia e posterior recolha do útero. Por sua vez, este foi processado para extração de ARN e avaliação de transcrição de genes relevantes. A partir desta fase as amostras dos grupos controlo e Dkk1 foram tratadas separadamente para o trabalho experimental que foi objeto desta dissertação de mestrado. Assim, foram analisados um total de 52 embriões, divididos em 2 grupos de tratamento (controlo e Dkk1) e em 3 estadios de desenvolvimento (20 MC, 20 BEX e 12 BCL).

O bloqueio da via Wnt foi confirmado pela nossa equipa através da análise da transcrição do gene LRP6 (um co-recetor necessário à ativação da via WNT canónica). Os embriões tratados com Dkk1 mostraram um aumento significativo da transcrição deste gene (Batista *et al.*, 2016), resultado de um fenómeno de feedback negativo (Li *et al.*, 2010). Os embriões tratados com Dkk1 desenvolveram-se mais rapidamente na fase de pré-implantação (Batista *et al.*, 2016) e deram origem a fetos de termo com pesos significativamente maiores do que os do grupo controlo (Batista *et al.*, resultados ainda não publicados).

1.2. Análise da transcrição de genes relevantes

A avaliação da transcrição de genes codificantes para enzimas relevantes na produção de PGs foi realizada em três estádios de desenvolvimento: MC, BEX e BCL. Para a análise de expressão gênica foram utilizadas 10 amostras por grupo e por estádio de desenvolvimento nas MC e nos BEX, e 6 amostras por grupo de tratamento nos BCL, sendo que cada embrião foi considerado como uma única amostra. No que respeita à avaliação de transcrição destes genes pelos LI, utilizou-se uma amostra por grupo e por sessão de tratamento, num total de 5 sessões, sendo que cada amostra foi obtida a partir de um *pool* de 2 a 4 LI. Em ambos os casos foi estudada a transcrição dos genes envolvidos na síntese das PGs, nomeadamente *COX-1*, *COX-2*, *mPGES1*, *mPGES2*, *cPGES*, *PGIS* e *PGFS*.

2. EXTRAÇÃO DE ARN E SÍNTESE DE ADNc

2.1. Embriões

Para a extração de ARN dos embriões utilizou-se o kit comercial *Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit* (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA), segundo as indicações do fabricante e adicionando a digestão de ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico com o kit comercial *RNase-free DNase Set* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). A pureza e concentração do ARN extraído foram avaliadas no equipamento *Nanodrop 2000C Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, EUA), através da medição dos rácios de absorvância a 260 nm versus 280 nm e absorvância 260 nm versus 230 nm (A260/280 e A260/230). Para uma amostra de ARN ser considerada pura, o rácio A260/280 deve ser aproximadamente 2 e o rácio A260/230 deve situar-se entre 2 e 2,2. Rácios A260/280 alterados significam normalmente contaminação com proteína ou com reagentes de extração, como os sais dos tampões; já a alteração do rácio 260/230 pode indicar um problema com a amostra ou com a técnica de extração (Desjardins & Conklin, 2010). As amostras de ARN foram guardadas a -80° C até à sua utilização.

No que respeita à síntese de ADNc (ADN complementar) foi utilizado o kit comercial *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo que por cada reação de síntese de ADNc foram utilizados 20 ng de ARN. Depois de sintetizado, o ADNc foi armazenado a -80° C até posterior utilização.

Devido à quantidade diminuta de material biológico inicial, optou-se por se fazer uma reação de pré-amplificação com o kit comercial *SsoAdvanced™ PreAmp Supermix* (Bio-Rad, Hercules, CA), de acordo com as indicações do fabricante. De seguida, o ADNc pré-amplificado foi diluído a 1:5 em tampão TE e armazenado a -20° C.

2.2. Locais de implantação

Os LI de cada útero foram processados em simultâneo para extração de ARN. Para o efeito, utilizou-se o kit comercial *Rneasy mini kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), segundo as indicações do fabricante. Em relação ao método de maceração escolhido, as amostras foram colocadas em tampão RLT (fornecido no kit) com adição de β -mercaptoetanol (M6250, Sigma-Aldrich, EUA) e de seguida maceradas no *Tissue lyser* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) a 25 Hz, durante 2 ou 3 ciclos de 30 segundos. Optou-se também por incluir a digestão de ADN genómico, utilizando-se o kit *RNase-free DNase Set*, de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, avaliou-se a pureza e a concentração do ARN extraído no equipamento *Nanodrop 2000C Spectrophotometer*, através da medição dos rácios de absorvância a 260 nm versus 280 nm e absorvância 260 nm versus 230 nm (A260/280 e A260/230). As amostras de ARN foram guardadas a -80° C até posterior utilização.

Para a síntese de ADNc foi utilizado o kit comercial *Superscript® III First Strand Synthesis Supermix for qRT-PCR* (Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA), de acordo com as indicações do fabricante, sendo que por cada reação de síntese de ADNc foram utilizados 200 ng de ARN. Depois de sintetizado, o ADNc foi diluído a 1:4 em água e armazenado a -20° C.

3. AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GENES

3.1. Oligonucleótidos iniciadores

A escolha dos oligonucleótidos iniciadores (também designados *primers*) assentou em três critérios:

- I. Evitar a amplificação de ADN genómico: com o auxílio do programa informático Primer3 Software (Untergasser *et al.*, 2012) desenharam-se os *primers* em dois exões adjacentes.
- II. Evitar a formação de estruturas secundárias (por exemplo, dímeros ou *hairpins*): confirmaram-se as sequências de cada *primer* no programa Primer Express® Software (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

III. Evitar homologias com outros genes: introduziram-se as sequências no NCBI Nucleotide Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e escolheram-se os *primers* que apresentaram menor homologia com outros genes.

Na tabela abaixo (Tabela 2) estão representadas as sequências nucleotídicas de cada *primer*, bem como o tamanho do respectivo produto de PCR (reação em cadeia da polimerase).

Tabela 2 – Primers utilizados para as reações de qRT-PCR

Gene	Sequência 5'-3'	Produto de PCR (pb)	Nº de Acesso (Genebank)
COX1	FW - GTCATCAAGGAGTCCCGAGAGA RV - CATCGATGTCACCGTACAGCTC	148	NM_008969.4
COX2	FW - ATGGGTGTGAAGGGAAATAAGGA RV - GCTGGGCAAAGAATGCAAAC	124	NM_011198.4
	FW - TGAGTGGGGTGATGAGCAAC RV - TGAGTTTGAAGTGGTAACCGC	116	NM_011198.4
cPGES	FW - GTATCGATCCAAATGATTCCAAGC RV - CTTTGCCCTTTCCTTTGTAAACCT	113	NM_019766.4
mPGES1	FW - GAGGATGCGCTGAAACGTG RV - GGAAATGTATCCAGGCGATCAG	118	NM_022415.3
mPGES2	FW - GAAGCCAGGACGGAGGAGAT RV - TGCCCTCACGGACAATGTAGT	130	NM_133783.2
PGFS (Akr1b3)	FW - GGGCTATTTAAAGGTGCGCGC RV - TGGGCATCTTGGTGCCGTTGTT	115	NM_009658.3
PGIS	FW - AGTGAGGAGAAGGCCAGGATG RV - AGCAGGGCGTTGTAGGAGAAC	167	NM_008968.3
RPS29	FW – CACGGTCTGATCCGCAAATAC RV - ACTAGCATGATCGGTTCCACTTG	144	NM_009093.2

3.2. qRT-PCR

Tendo em conta a diferença entre a quantidade de material genético obtido a partir das amostras de endométrio e dos embriões, as condições do qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real) foram otimizadas para cada uma das análises.

No que respeita à avaliação da transcrição de genes pelos LI, o qRT-PCR foi realizado com 2,5 ng de ADNc, 80 nM de cada *primer* e 6,25 µL de Perfecta® Sybr® Green Fast Mix, ROX™ (733-1386, Quanta bio, MA, USA), num volume final de 12,5 µL. Em relação aos embriões, o qRT-PCR foi realizado utilizando 1,25 µL de ADNc pré-amplificado diluído a 1:5, 80 nM de cada *primer* e 6,25 µL Sybr Green, num volume final de 12,5 µL. Todas as reações foram realizadas em duplicado e em placas de 96 poços (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, EUA), utilizando o gene *RPS29* (*ribossomal protein S29*) como controlo endógeno. As reações de amplificação foram realizadas no equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems), utilizando-se o ciclo universal: pré-incubação a 95° C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos a duas temperaturas (95° C durante 15 segundos seguido de 60° C durante 1 minuto). Foi ainda realizado um ciclo final de obtenção de curvas de dissociação, de forma a confirmar que apenas um produto de PCR estava a ser amplificado em cada poço de reação. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (2,5 %) para confirmação do seu tamanho, e ainda enviados para sequenciação, de forma a garantir a sua especificidade. Os dados relativos à quantificação da transcrição de ARNm (ARN mensageiro) foram normalizados utilizando-se o algoritmo *Real-time PCR Miner* (Zhao & Fernald, 2005).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o programa informático IBM SPSS *Statistics* (versão 22, IBM® SPSS® Statistics, 2013). Os dados obtidos de qRT-PCR, referentes à quantificação da transcrição de ARNm pelos embriões e normalizados pelo algoritmo *Real-Time PCR Miner* (Zhao & Fernald, 2005), foram submetidos a uma análise de ANOVA fatorial, considerando um modelo 3x2 (estadio de desenvolvimento x grupo de tratamento). Os resultados significativos obtidos nesta análise foram de seguida submetidos a um teste *post-hoc* de LSD. Os dados obtidos do qRT-PCR, referentes à quantificação da transcrição de ARNm pelos LI e normalizados pelo algoritmo *Real-Time PCR Miner* (Zhao & Fernald, 2005), foram submetidos a um teste-T de amostras independentes.

Foram considerados estatisticamente significativos nesta análise os resultados com valor de $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

1. Transcrição de genes associados à via das PGs pelos embriões

O nível de transcrição dos genes que codificam para as principais sintases da via das PGs foi analisado num total de 52 embriões, divididos em 3 estádios de desenvolvimento (20 MC, 20 BEX e 12 BCL).

O gene que codifica para a cPGES foi o mais transcrito em todos os estádios de desenvolvimento, seguido dos genes das sintases membranares da PGE_2 e da *PGFS*. A *PGIS* e a *COX-1* pareceram ser os genes com menor nível de transcrição em todos os estádios de desenvolvimento analisados.

Em relação ao bloqueio da via Wnt pelo Dkk1, não foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, controlo e tratado, para nenhum dos genes ou dos estádios de desenvolvimento analisados ($p>0,05$), como se pode observar na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados (valores de p) da ANOVA fatorial para o nível de transcrição dos genes alvo nos embriões.

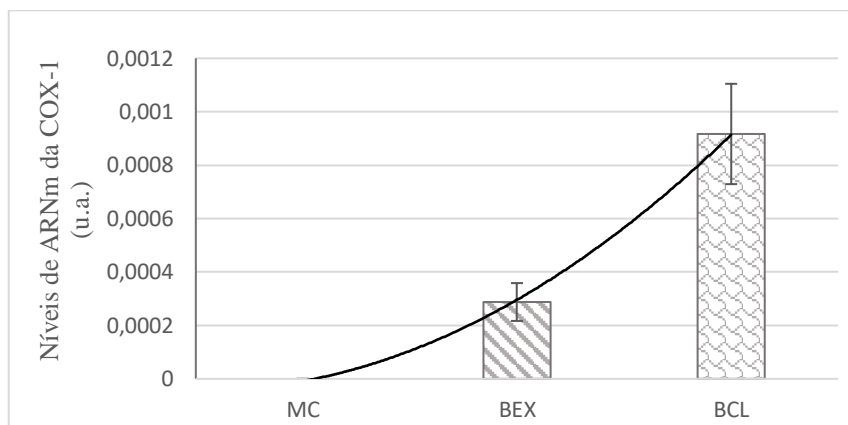
Gene Alvo	Efeito		
	Tratamento	Estadio de desenvolvimento	Interação Tratamento vs. Estadio
cPGES	0,791	0,000	0,799
mPGES-1	0,127	0,000	0,071
mPGES-2	0,587	0,000	0,905
PGIS	0,753	0,611	0,478
PGFS	0,832	0,000	0,727

Uma vez que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao efeito do tratamento, nem interação entre o tratamento e o estadio de desenvolvimento, os dois grupos (controlo e Dkk1) foram analisados em conjunto para a avaliação do padrão de transcrição dos genes associados à via das PGs ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação do ratinho.

O ARNm do gene que codifica para a *COX-1* foi detetado em 66,7% dos BCL e 25% dos BEX, não tendo sido detetado em nenhuma das 20 MC analisadas, o que representa transcrição deste gene em apenas 25% da totalidade das amostras. Comparando o nível de transcrição da *COX-1* nos diferentes estádios de desenvolvimento analisados, parece existir uma tendência para o

aumento da transcrição deste gene ao longo do desenvolvimento embrionário (Figura 10). Contudo, tendo em conta que o número da amostra é reduzido, não foi possível aferir se as diferenças observadas são estatisticamente significativas.

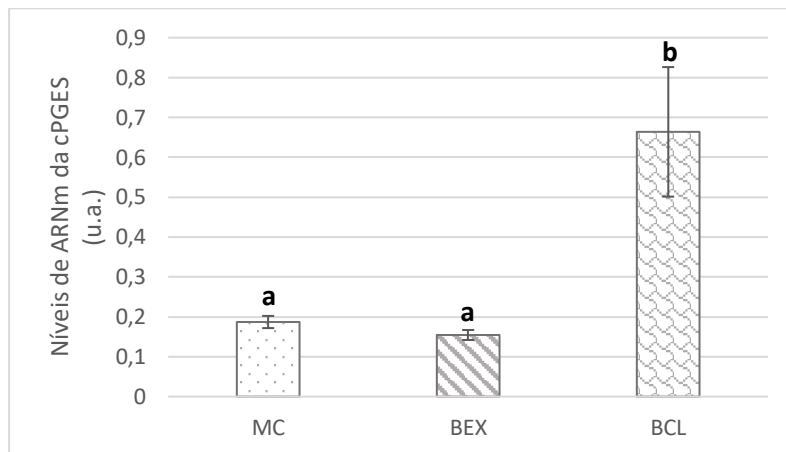
Figura 10 – Níveis de transcrição da *COX-1* nos três estadios analisados: MC (mórula compacta), BEX (blastocisto expandido) e BCL (blastocisto eclodido). As colunas representam os níveis de transcrição do gene em unidades arbitrárias (u.a.) e as barras de erro o erro padrão da média (SEM); a curva representa a linha de tendência do gráfico.



Em relação à *COX-2*, não foi detetada transcrição do gene que codifica para esta enzima em nenhum dos 52 embriões analisados, com qualquer um dos pares de *primers* testados para a análise. Ambos os pares de *primers* foram usados para a análise dos LI, com deteção de produto amplificado, conforme demonstrado mais à frente neste documento (Figura 15).

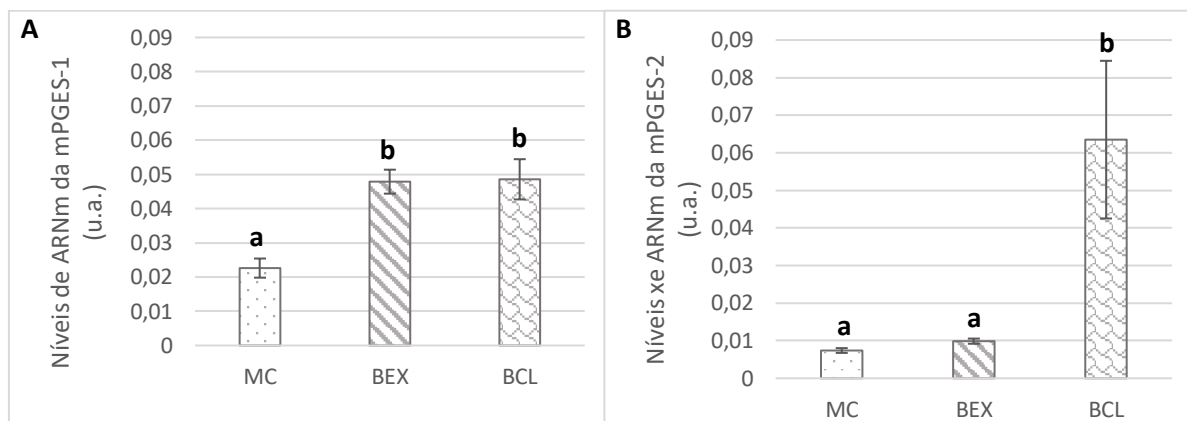
O gene que codifica para a *cPGES* parece ter sido o mais transcrito em todos os estadios de desenvolvimento (Figura 11). Analisando o nível de transcrição deste gene ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação, é possível observar que nos BCL há um aumento significativo da transcrição em relação aos restantes estadios analisados ($p < 0,05$). Não parece haver diferenças estatisticamente significativas entre o nível de transcrição de *cPGES* nas MC e nos BEX ($p > 0,05$).

Figura 11 - Níveis de transcrição da *cPGES* nos três estádios analisados: MC (mórula compacta), BEX (blastocisto expandido) e BCL (blastocisto eclodido). As colunas representam os níveis de transcrição do gene em unidades arbitrárias (u.a.) e as barras de erro o erro padrão da média (SEM). Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).



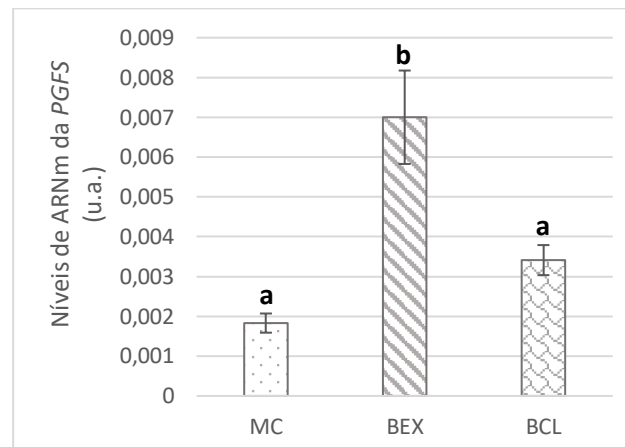
Quanto às sintases membranares da PGE, a *mPGES-1* parece ter sido mais transcrita do que a *mPGES-2* nas MC e nos BEX, mas nos BCL observa-se o inverso (Figura 12). Relativamente à *mPGES-1*, verificou-se um nível de transcrição significativamente mais elevado nos BEX e nos BCL quando comparados com as MC ($p < 0,05$); no entanto, não parecem existir diferenças estatisticamente significativas entre os BEX e os BCL ($p > 0,05$). Já no caso da *mPGES-2*, foi possível observar que os BCL apresentam uma transcrição deste gene significativamente mais elevada do que qualquer um dos outros estádios de desenvolvimento analisados ($p < 0,05$), embora não se verifiquem diferenças estatisticamente significativas no nível de transcrição da *mPGES-2* entre as MC e os BEX ($p > 0,05$).

Figura 12 - Níveis de transcrição da *mPGES-1* (A) e da *mPGES-2* (B) nos três estádios analisados: MC (mórula compacta), BEX (blastocisto expandido) e BCL (blastocisto eclodido). As colunas representam os níveis de transcrição do gene em unidades arbitrárias (u.a.) e as barras de erro o erro padrão da média (SEM). Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).



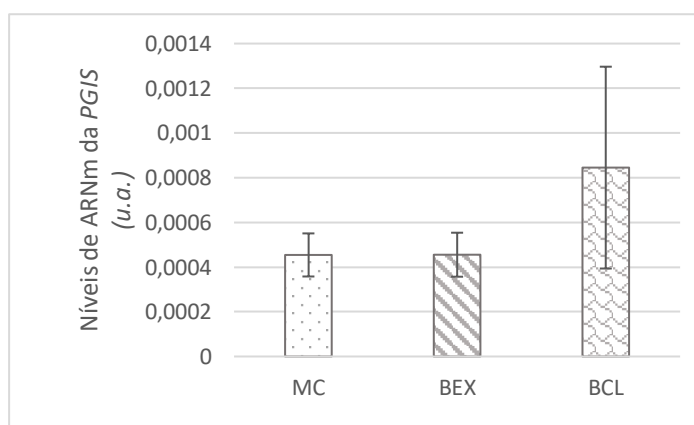
A *PGFS* foi uma das sintases com menor nível de transcrição nos estádios analisados, tendo sido detetada apenas em 65,4% da totalidade das amostras analisadas (55% das MC, 90% dos BEX e 41,7% dos BCL). Os BEX apresentaram uma transcrição deste gene significativamente superior quando comparado com os restantes estádios analisados ($p < 0,05$). Apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de transcrição das MC e dos BCL, estes últimos parecem ter um nível de transcrição de *PGFS* ligeiramente superior (Figura 13).

Figura 13 - Níveis de transcrição da *PGFS* nos três estádios analisados: MC (mórula compacta), BEX (blastocisto expandido) e BCL (blastocisto eclodido). As colunas representam os níveis de transcrição do gene em unidades arbitrárias (u.a.) e as barras de erro o erro padrão da média (SEM). Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).



Por fim, a *PGIS* parece ter sido a sintase terminal com menor nível de transcrição em todos os estádios de desenvolvimento analisados, tendo sido detetada apenas em 44,2% da totalidade das amostras analisadas (45% das MC, 45% dos BEX e 41,7% dos BCL). No caso deste gene, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de transcrição dos diferentes estádios de desenvolvimento, embora pareça existir um aumento da transcrição da *PGIS* dos BEX para os BCL (Figura 14).

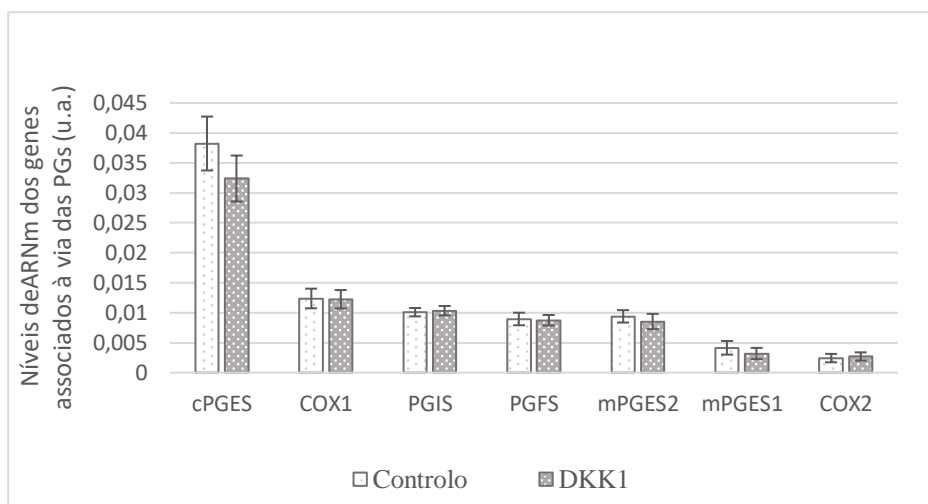
Figura 14 - Níveis de transcrição da *PGIS* nos três estádios analisados: MC (mórula compacta), BEX (blastocisto expandido) e BCL (blastocisto eclodido). As colunas representam os níveis de transcrição do gene em unidades arbitrárias (u.a.) e as barras de erro o erro padrão da média (SEM).



2. Transcrição de genes associados à via das PGs pelos LI

Em relação ao padrão de transcrição de genes associados à via das PGs pelos LI aos 5 dias de gestação, podemos verificar que o gene que codifica para cPGES é o mais transcrito, seguido da COX-1, PGIS, PGFS, sintases membrares da PGE₂ e, por fim, a COX-2 (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do tratamento dos embriões com Dkk1 nos níveis de transcrição pelos LI dos genes associados à via das PGs: *COX-1*, *COX-2*, *cPGES*, *mPGES-1*, *mPGES-2*, *PGIS* e *PGFS*. As colunas representam os níveis de transcrição dos genes em unidades arbitrárias (u.a.) e as barras de erro o erro padrão da média (SEM).



No que respeita ao bloqueio da via Wnt pelo Dkk1, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados, controlo e Dkk1, para nenhum dos genes avaliados ($p > 0,05$), conforme se pode observar na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados (valores de p) do teste T de amostras independentes para o nível de transcrição dos genes alvo nos locais de implantação.

Gene Alvo	COX-1	COX-2	cPGES	mPGES-1	mPGES-2	PGIS	PGFS
Efeito do Tratamento	0,954	0,792	0,298	0,538	0,614	0,820	0,916

VI. DISCUSSÃO

A mortalidade embrionária precoce em humanos, que ocorre frequentemente devido a erros antes, durante ou imediatamente após a implantação, é uma preocupação a nível mundial com grandes implicações sociais e económicas (Wang & Dey, 2006). Apesar da vasta investigação existente nesta área, ainda não são conhecidos todos os mecanismos biológicos envolvidos nesta fase tão crítica do desenvolvimento embrionário.

Sabendo já do envolvimento das vias Wnt/ β -catenina e das PGs nos eventos peri-implantação, foi objetivo deste trabalho indagar sobre uma possível interação entre estas duas vias de sinalização e caracterizar o padrão de transcrição dos elementos da via de produção das PGs no embrião murino ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação.

Até à data, apenas um trabalho tentou demonstrar a interação entre as vias de sinalização Wnt e PG em eventos reprodutivos, tendo utilizado para o efeito uma cultura de células trofoblásticas humanas (Nayeem *et al.*, 2015). Em relação à via das PGs, alguns estudos descrevem a expressão das enzimas associadas a esta via ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação no ratinho (Niimura & Ishida, 1987; Marshburn *et al.*, 1990; van der Weiden *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2005; Pakrasi & Jain, 2007), no entanto o padrão de transcrição dos genes associados à via das PGs ao longo deste período nesta espécie é, de acordo com que sabemos, descrito pela primeira vez neste trabalho.

A COX, enzima limitante no processo de biossíntese de PGs, tem duas isoformas – COX-1 e COX-2. Os resultados deste trabalho mostram que apenas o gene que codifica para a COX-1 é transcrito pelo embrião em níveis detetáveis pelo método utilizado e apenas a partir do estadio de BEX. Parece verificar-se também um padrão de transcrição crescente deste gene ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação. Estes resultados são, no entanto, contraditórios aos encontrados na literatura para outras espécies. Relativamente à COX-2, um estudo com embriões de bovino referiu a transcrição deste gene nos estadios de BL e BEX (Torres *et al.*, 2014) e um outro, que recorreu a análise por qRT-PCR em embriões de hamster, descreveu transcrição nos estadios de 8 células, MC, BL e BLC (Roy & Seshagiri, 2013). Este último trabalho recorreu à análise de *pools* de pelo menos 20 embriões. Apesar de apenas ter sido utilizada a quantidade de ADNc equivalente à de um embrião, a utilização desta técnica dilui as diferenças que possam existir entre indivíduos e, por isso, consegue-se detetar a transcrição deste gene mesmo quando parte dos indivíduos não o transcreve. Deste modo, os resultados deste tipo de análise representam os níveis médios de ARNm do *pool*, descurando a variabilidade genética existente entre os diferentes indivíduos, e diminuindo significativamente

a robustez da experiência realizada (Jong *et al.*, 2010). O nosso trabalho analisa cada embrião individualmente, sendo por isso os resultados representativos da transcrição individual de cada embrião. Alternativamente, a discordância dos nossos resultados com os de Roy e Seshagiri (2013) e de Torres *et al.* (2014) pode prender-se com variações interespecíficas e, assim sendo, o nível de transcrição destes genes poderá não ser conservado entre espécies. Por outro lado, um estudo realizado em embriões de rato, demonstrou que estes transcrevem COX-1 mas não COX-2, durante a organogénese (Streck, Kumpf, Ozolins & Stedman, 2003). Em 1990, Marshburn *et al.* usaram um método de imunohistoquímica para demonstrar a presença de COX-1 em embriões de murganho presentes em secções de útero e oviduto. Em 1996, van der Weiden *et al.* confirmaram estes resultados demonstrando a presença da mesma enzima em embriões murinos desde o estadio de 2 células até ao BL, sendo que neste último estadio foi observada uma diminuição da expressão de COX-1. Mais tarde, Tan *et al.* (2005) descreveram um padrão crescente de expressão de COX-1 desde o embrião de 2 células até à MC, diminuindo ligeiramente no BL, bem como uma elevada expressão de COX-2 desde o estadio de 2 células até ao BL. Também Pakrasi e Jain (2007) obtiveram resultados semelhantes, detetando por imunohistoquímica a expressão de COX-1 a partir do estadio de 2 células e de COX-2 a partir do embrião de 8 células. Todos estes estudos diferem significativamente do trabalho aqui apresentado pelo facto de terem investigado e detetado expressão proteica e não transcrição génica. A discrepância de resultados pode ser explicada pelo facto de nem sempre os níveis de proteína se correlacionarem com os níveis de ARNm, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Peshkin *et al.*, 2015). O estudo anteriormente referido, demonstrou a existência de dois padrões proteicos no embrião: as proteínas de origem materna, mais estáveis e que se encontram em níveis mais elevados, e um conjunto mais dinâmico e menos abundante, de origem embrionária. Isto leva-nos a uma das fases críticas do desenvolvimento embrionário, a transição materno-embrionária. Esta transição parece ser gradual, sendo que as proteínas maternas podem ter um papel ativo até pelo menos ao estadio de BL (revisto por Li, Lu & Dean, 2013).

Relativamente às PG sintases, os genes que codificam para as sintases da PGE₂, nomeadamente a *cPGES*, parecem ser os mais transcritos em todos os estadios de desenvolvimento. Os BCL apresentaram um nível de transcrição do gene que codifica para a *cPGES* significativamente superior quando comparados com as MC ou os BEX. Quanto às sintases membranares da PGE, a *mPGES-1* parece ser mais transcrita do que a *mPGES-2* nas MC e nos BEX, mas nos BCL observa-se o inverso. Verificou-se ainda que os BEX e os BCL transcrevem significativamente mais *mPGES-1* do que as MC, e que os BCL apresentam uma transcrição de *mPGES-2*

significativamente mais elevada do que qualquer um dos outros estadios de desenvolvimento analisados. Em 1987, Niimura e Ishida, demonstraram pela primeira vez a presença de PGE₂ em embriões de ratinho, desde o estadio de zigoto até ao BL. A PGE₂ é uma das PGs mais abundantes no organismo animal e desempenha um vasto leque de funções biológicas (revisto por Ricciotti & FitzGerald, 2011). Uma vez que a PGE₂ já tinha sido implicada no mecanismo de transporte de fluidos noutros tecidos, sugeriu-se que esta PG fosse também responsável pela formação e expansão do blastocelo e, conseqüentemente, pelo aumento da pressão nesta cavidade, que resultaria no início do processo de eclosão embrionária (Biggers, Leonov, Baskar & Fried, 1978; Baskar *et al.*, 1981). Mais tarde, verificou-se que a suplementação do meio de cultura com PGE₂ aumentava a taxa de eclosão de embriões de ovino *in vitro* (Sayre & Lewis, 1993), o que veio reforçar a ideia de que esta PG teria um papel ativo neste evento do desenvolvimento embrionário. Adicionalmente, os resultados descritos por Tan *et al.* (2005) sobre a expressão destas enzimas pelo embrião murino até ao estadio de BL confirmaram uma expressão mais elevada destas sintases neste estadio, sugerindo assim uma produção elevada de PGE₂, que por sua vez é compatível com o envolvimento desta PG nos processos de eclosão e implantação. Os nossos resultados parecem também suportar esta ideia, uma vez que se verificou um aumento significativo na transcrição de todas as sintases da PGE₂ no estadio de BCL, quando comparado com os restantes estadios analisados. Além disso, uma vez que se verificou o mesmo padrão de aumento de transcrição ao longo do desenvolvimento embrionário para a *COX-1*, parece existir uma preferência pela via COX-1/PGES para a síntese da PGE₂ nesta fase do desenvolvimento embrionário do ratinho. Já havia sido referida a preferência da cPGES para a conversão da PGH₂ derivada da COX-1 (Tanioka, Nakatami, Semmyo, Murakami & Kudo, 2000) e a capacidade da mPGES-2 sintetizar PGE₂ por ambas as vias (Murakami *et al.*, 2003). O estudo de Tan *et al.* (2005) não estabelece a via preferencial de produção desta PG, apesar de ter concluído que a mesma deve ser elevada no estadio de BL. No entanto, o mesmo parece não acontecer para outras espécies. Os resultados de um trabalho que avaliou a expressão das enzimas envolvidas na síntese de PGE₂ por embriões de bovino cultivados *in vitro*, sugere a utilização exclusiva da via COX-2/mPGES-1 nos estadios de MC e BL (Saint-Dizier, Grimard, Guyader-Joly, Humblot & Ponter, 2011). Contudo, independentemente das diferenças inter-específicas, todos estes trabalhos sugerem a importância da PGE₂ na expansão do blastocelo, que conduz à eclosão embrionária, e no desenvolvimento da competência para a implantação.

Em relação às restantes PG sintases, a PGFS, seguida da PGIS, foram as sintases com menor nível de transcrição em todos os estadios analisados no nosso trabalho. Os BEX apresentaram uma transcrição de *PGFS* significativamente superior quando comparado com as MC ou os

BCL. A transcrição desta sintase e consequente produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ já foi referida pela nossa equipa em embriões de bovino cultivados *in vitro* até ao dia 7, correspondente ao desenvolvimento embrionário pré-eclosão (Torres *et al.*, 2013, 2014). Contudo, o papel da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no desenvolvimento embrionário é ainda controverso. Quando adicionada ao meio de cultura, esta PG parece diminuir as taxas de rendimento e de eclosão dos BL de coelho (Maurer & Beier, 1976), rato (Buuck *et al.*, 1997) e bovino (Fazio, Buuck & Schrick, 1997; Scenna *et al.*, 2004). Por outro lado, Soto *et al.* (2003) não verificaram quaisquer efeitos inibidores da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no desenvolvimento embrionário bovino quando esta era adicionada ao meio de cultura após a fertilização. Finalmente, Sayre (2007) verificou que a taxa de eclosão de embriões caprinos aumentava na sequência de uma razão $\text{PGE}:\text{PGF}_{2\alpha}$ elevada. Além disso, são várias as enzimas com atividade PGFS, sendo que a maioria pertence à família das AKRs (Watanabe, 2002). Até à data, a AKR1b3 parece ser a única AKR com expressão no ratinho cujo único produto é a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Pratt-Hyatt, Lickteig & Klaassen, 2013), razão pela qual esta foi escolhida para integrar este trabalho. No entanto, é possível que existam outras enzimas envolvidas na síntese desta PG no murganho e que possa existir uma preferência por uma determinada via de produção em cada fase do desenvolvimento embrionário, à semelhança do que se tem verificado para a PGE_2 .

A PGIS parece ser a sintase terminal com menor nível de transcrição em todos os estadios de desenvolvimento analisados. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de transcrição dos diferentes estadios de desenvolvimento, embora pareça existir um aumento da transcrição da PGIS dos BEX para os BCL. Huang *et al.*, (2004) demonstraram que a PGI_2 , ou prostaciclina, é um mediador importante na eclosão dos blastocistos, visto que a inibição da eclosão embrionária era conseguida através da adição de um inibidor das PGs ao meio de cultura dos embriões, e que esta ação poderia ser revertida com um análogo da PGI_2 , mas não com PGE_2 ou $\text{PGF}_{2\alpha}$. Além disso, mediram o perfil de eicosanóides produzidos pelos embriões e concluíram que a prostaciclina é a PG produzida em maior quantidade, ao passo que a PGE_2 e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ são produzidas apenas em pequenas quantidades. O perfil de eicosanóides no embrião parece não ser conservado entre espécies, pelo que embriões de espécies diferentes apresentam um perfil de produção de PGs diferente (Lewis, 1989). Nomeadamente, embriões de bovino parecem produzir maioritariamente $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Lewis, 1989; Torres *et al.*, 2014) enquanto que embriões de suíno produzem maioritariamente PGE_2 . Apesar dos resultados de Huang *et al.* (2004) indicarem que a prostaciclina é o eicosanóide mais produzido no embrião murino, outros estudos apontam para a importância da PGE_2 e da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nos mecanismos que conduzem à implantação (Chan, 1991; Vilella *et al.*, 2013). Adicionalmente, salienta-se mais

uma vez que nem sempre os níveis de ARNm se correlacionam com os de proteína (Peshkin *et al.*, 2015).

No que se refere aos LI, os nossos resultados apontam para uma transcrição mais elevada de *cPGES*, seguida de *COX-1*, *PGIS*, *PGFS*, sintases membrares da PGE_2 e, por fim de *COX-2*. As PGs já foram implicadas no aumento localizado da permeabilidade vascular no endométrio que, por sua vez, parece ser um pré-requisito essencial para a ocorrência da reação de decidualização do endométrio e consequente início do processo da implantação do embrião (revisto por Kennedy *et al.*, 2007). Em 1996, Chakraborty, Das, Wang e Dey estudaram por métodos de *Northern Blot* e imunohistoquímica a expressão dos genes que codificam para as COXs no útero de ratinho e verificaram que a presença de ARNm de *COX-1* durante o período pré-implantação era mais elevada no dia 4 e que diminuía com o início da reação de adesão do BL ao endométrio; pelo contrário, o ARNm de *COX-2* foi detetado com o início da reação de adesão exclusivamente nas áreas do endométrio que envolviam o BL. O nosso trabalho aponta para uma transcrição mais elevada de *COX-1* nos LI, indicando um papel mais ativo desta enzima na síntese de PGs nesta fase da gestação, quando comparada com a *COX-2*. Apesar dos primeiros estudos com ratinhos mutantes (*knock-out*) para *COX-2* terem indicado que esta enzima seria essencial para diversos mecanismos da reprodução feminina, nomeadamente para a implantação (Lim *et al.*, 1997, 1999), os resultados de Cheng e Stewart (2003), demonstram que a deficiência em *COX-2* limita a decidualização mas não afeta significativamente as taxas de implantação nem a capacidade destas fêmeas levarem uma gestação até termo.

Em relação às PG sintases, o ARNm da *cPGES* é detetado intensamente nas células do estroma que envolvem o embrião e no útero com implantação atrasada após tratamento com estrogénio, diferindo das áreas entre LI ao dia gestacional 5 e de úteros pseudo-gestantes (Ni, Sun, Ma & Yang, 2003). O mesmo grupo de trabalho já havia referido a presença de ARNm da *mPGES* no estroma sub-luminal que envolve o embrião, que assim diferia das áreas entre LI ao dia gestacional 5 e de úteros pseudo-gestantes (Ni *et al.*, 2002). Os resultados de Ni *et al.* (2002, 2003) apontam para a importância da *cPGES* na permeabilidade vascular que se observa na primeira fase de adesão do embrião ao endométrio, e da *mPGES* nos processos de decidualização e implantação, suportando assim os nossos resultados e sugerindo mais uma vez o papel central da PGE_2 nesta fase do desenvolvimento embrionário. Lim *et al.* (1999) observou que a PGI_2 era a PG mais prevalente, seguida da PGE_2 , nos LI do ratinho, e que era também a PG-chave na implantação. No entanto, Kennedy (1979) mostrou que no rato apenas a PGE_2 estaria envolvida no aumento da permeabilidade vascular nos LI, e, no hamster, a PGE_2 também se mostrou como a PG mais prevalente nos LI (Wang *et al.*, 2004).

Relativamente à interação entre as duas vias de sinalização Wnt e PG, os nossos resultados mostram que os níveis de transcrição dos genes envolvidos na via das PGs não foram alterados pelo bloqueio da via Wnt com Dkk1, tanto nos embriões tratados como no endométrio onde estes se implantaram, sugerindo então a ausência de uma interação entre as duas vias aqui estudadas. Resultados anteriores da nossa equipa mostram que o bloqueio da via Wnt/ β -catenina foi responsável por um aumento da cinética de desenvolvimento dos embriões *in vitro* (Batista *et al.*, 2016), que por sua vez resultam em fetos de termo com pesos significativamente maiores que o controlo (Batista *et al.*, resultados ainda não publicados), sugerindo que esta via tem um papel inibidor do desenvolvimento embrionário e fetal. Como já foi referido anteriormente, a via das PGs está descrita como sendo essencial e indispensável para o desenvolvimento embrionário pré-implantação e para a implantação propriamente dita. Neste trabalho, demonstrámos que o padrão de transcrição das PGs no embrião vai-se alterando com a progressão do desenvolvimento embrionário, sendo significativamente superior no estadio de BCL. No entanto, não parece haver evidências de que uma maior cinética de desenvolvimento influencie a produção de PGs no embrião. Isto é, um BCL do grupo Dkk1 pode ter atingido este estadio de desenvolvimento mais rápido do que um controlo, no entanto, comparando ambos os embriões no mesmo estadio, não existem diferenças significativas na transcrição dos genes associados à via das PGs. De facto, corroborando estes resultados de análise de transcrição, o bloqueio da via Wnt também não pareceu afetar significativamente as taxas de implantação aos 5 e aos 18 dias de gestação nem a viabilidade fetal aos 18 dias (Batista *et al.*, resultados ainda não publicados). Nayeem *et al.* (2015) demonstraram pela primeira vez a interação entre estas duas vias de sinalização em células do trofoblasto, fazendo um ensaio inicial onde colocaram em cultura células trofoblásticas e decíduais isoladamente e em co-cultura, e analisando a transcrição e expressão de elementos associados à via Wnt e das PGs em culturas de células decíduais, de células do trofoblasto e da co-cultura de ambos. Deste primeiro ensaio, concluíram que a co-cultura resultava em aumento da transcrição e expressão dos antagonistas da via Wnt, diminuição da sinalização Wnt canónica, aumento da transcrição e expressão de COX-1 relativamente à cultura de células do trofoblasto isoladamente e aumento da produção de PGE₂ relativamente às células da decídua e do trofoblasto isoladamente, evidenciando a importância da comunicação embrio-materna nesta fase da implantação. Num segundo ensaio, estes autores colocaram individualmente as células da decídua e do trofoblasto numa cultura de 3 dias com Dkk1 ou sFRP4 isoladamente, por forma a inibir farmacologicamente a via Wnt canónica. Deste ensaio, concluíram que apenas o tratamento com sFRP4 era capaz de aumentar significativamente a expressão de COX-1 na cultura do trofoblasto e que a produção de PGE₂

aumentava significativamente na cultura de células do trofoblasto após tratamento com qualquer um dos dois antagonistas da via Wnt analisados. Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas na produção de PGE₂ pelas células da decídua após o tratamento com qualquer um dos antagonistas utilizados (Nayeem *et al.*, 2015). Os resultados do trabalho desta dissertação demonstraram que o tratamento dos embriões com Dkk1 não afetou significativamente a transcrição de genes associados à via das PGs pelos LI, o que está de acordo com os resultados de Nayeem *et al.* (2015). O nosso trabalho também demonstrou que o tratamento dos embriões com Dkk1 não parece afetar significativamente a transcrição dos mesmos genes pelos embriões. Apesar dos resultados de Nayeem *et al.* (2015) terem demonstrado um aumento da produção de PGE₂ pelas células do trofoblasto tratadas com Dkk1, não foram observadas diferenças significativas na expressão de COX-1, enzima limitante na biossíntese de PGs, nas células tratadas com este antagonista. Desta forma, estes resultados parecem sugerir uma vez mais que a produção de PGE₂ pelo embrião nesta fase inicial do desenvolvimento embrionário pode não estar dependente apenas da síntese das enzimas associadas à via das PGs pelo próprio, mas sim de uma via alternativa de produção, nomeadamente do *pool* de proteínas de origem materna.

VII. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi, de acordo com o que sabemos, descrito pela primeira vez o padrão de transcrição dos genes associados à via das PGs no embrião murino. Neste sentido, foi possível concluir que a PGE₂ parece ser a PG com maior importância no desenvolvimento embrionário pré-implantação, no processo de eclosão e na aquisição de competência do embrião para a implantação. Além disso, parece existir nesta espécie uma preferência pela via COX-1/PGES para a síntese de PGE₂, tanto no embrião como nos locais de implantação.

A análise de transcrição dos genes associados à via das PGs pelo endométrio também revelou que a principal PG produzida nos LI nesta fase será a PGE₂.

Por fim, concluiu-se que não parece existir uma interação entre as vias de sinalização Wnt-PG no desenvolvimento e competência do embrião para a implantação.

Em estudos futuros seria interessante fazer ensaios de co-cultura *in vitro* de células endometriais com embriões, de modo a avaliar a transcrição de genes associados à via das PGs nos embriões, na presença e na ausência das células endometriais, e vice-versa; adicionalmente, medir a concentração de PGs no meio cultura dos embriões, das células e da co-cultura.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Araki, Y., Okamura, S., Hussain, S.P., Nagashima, M., He, P., Shiseki, M., Miura, K. & Harris, C.C. (2003). Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by the Wnt and Ras Pathways. *Cancer Research*, 63 (3), 728-734.
- Baskar, J.F., Torchiana, D.F., Biggers, J.D., Correy, E.J., Andersen, N.H. & Subramanian, N. (1981). Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by various prostaglandin antagonists. *J. Reprod. Fert.*, 63, 359-363.
- Batista, M., Diniz, P., Torres, A., Murta, D., Mateus, L., Lopes-d a-Costa, L. & Silva, E. (2016). Notch and Wnt interplay in the regulation of the pace of embryo developmental kinetics [abstract] [versão electrónica]. In Rodriguez-Martinez, M. (Ed.), *Proceedings of the 20th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) and the 13th Conference of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA): Oral Communications, Lisbon, Portugal, 27–29 October 2016*, [Reproduction in Domestic Animals, 51 (S2)], (55-65). Acedido em Jul. 17, 2017 em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.2016.51.issue-S2/issuetoc>
- Bennet, J.P. & Vickery, B.H. (1970). Rats and Mice. In E.S.E. Hafez (Ed.). *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. (pp. 299-315). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Bevilacqua, E.M.A.F. & Abrahamsohn, P.A. (1989). Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. *Archivos de biología y medicina experimentales*, 22 (2), 107-118.
- Biggers, J.D., Leonov, B.V., Baskar, J.F. & Fried, J. (1978). Inhibition of Hatching of Mouse Blastocysts in vitro by Prostaglandin Antagonists. *Biology of Reproduction*, 19, 519-533.
- Biggers, J.D., Baskar, J.F. & Torchiana, D.F. (1981). Reduction of fertility of mice by the intrauterine injection of prostaglandin antagonists. *Journal of Reproduction & Fertility*, 63, 365-372.
- Brinster, R.L. (1968). Effect of glutathione on the development of two-cell mouse embryos *in vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility*, 17, 521-525.
- Brown, J.J.G. & Whittingham, D.G. (1992). The dynamic provision of diferente energy substrates improves development of one-cell random-bred mouse embryos *in vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility*, 95, 503-511.
- Buchanan, F.G. & DuBois, R.N. (2006). Connecting COX-2 and Wnt in Cancer. *Cancer Cell*, 9 (1), 6-8.
- Buuck, M.J., Breuel, K.F., Fukuda, A. & Schrick, F.N. (1997). Embryonic development of the rat associated with elevated prostaglandin F2 α . *Biol. Reprod.*, 56 (Supl. 1), 188.

- Chakraborty, I., Das, S.K., Wang, J. & Dey, S.K. (1996). Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *Journal of Molecular Endocrinology*, 16, 107-122.
- Chan, S.Y. (1991). Effects of Prostaglandin E₂ and F_{2α} on Peri-Implantation Development of Mouse Embryos *in Vitro*. *Prostaglandins*, 42 (4), 321-336.
- Chen, Q., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Wang, S., Cao, Y., Wang, H. & Duan, E. (2009). Embryo-uterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *Molecular Human Reproduction*, 15 (4), 215-221.
- Cheng, J-G. & Stewart, C.L. (2003). Loss of Cyclooxygenase-2 Retards Decidual Growth but Does Not Inhibit Embryo Implantation or Development to Term. *Byology of Reproduction*, 68, 401-404.
- Cui, L., Zhang, Z., Sun, F., Duan, X., Wang, M., Di, K., Li, X. (2014). Transcervical embryo transfer in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 53(3), 228-31.
- Dekel, N., Gnainsky, Y., Granot, I., Racicot, K. & Mor, G. (2014). The role of inflammation for a successful implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72, 141-147.
- Desjardins, P. & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J. Vis Exp*, 22 (45). pii: 2565.
- Evans, C.A. & Kennedy, T.G. (1978). The importance of prostaglandin synthesis for the initiation of blastocyst implantation in the hamster. *J. Reprod. Fert.*, 54, 225-261.
- Fazio, R.A., Buuck, M.J. & Schrick, F.N. (1997). Embryonic development of frozen-thawed bovine embryos cultured *in vitro* in response to elevated concentrations of prostaglandin F_{2α}. *Biol. Reprod.*, 56 (Suppl. 1; Abstr.), 187.
- Gardner, D.K. & Leese, H.J. (1988). The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*, 104, 423-429
- Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Puder, M., Daley, G.Q., Moon, R.T., & Zon, L.I. (2009). Genetic interaction of PGE₂ and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell*, 136 (6), 1136-1147.
- Hantak, A.M., Bagchi, I.C. & Bagchi, M.K. (2014). Role of uterine stromal-epithelial crosstalk in embryo implantation. *The International Journal of Developmental Biology*, 58, 139-146.
- Helliwell, R.J.A., Adams, L.F. & Mitchell, M.D. (2004). Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70, 101-113.
- Hertelendy, F. & Zakár, T. (2004). Prostaglandins and the myometrium and the cervix. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70, 207-222.

- Hill, M.A. (2017a). *Embryology: Blastocyst Development*. Acedido em Fev. 10, 2017, em https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Blastocyst_Development
- Hill, M.A. (2017b). *Embryology: Mouse Development*. Acedido em Jan. 24, 2017, em https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Development
- Holmes, P.V. & Gordashko, B.J. (1980). Evidence of prostaglandin involvement in blastocyst implantation. *J. Embryol. exp. Morph.*, 55, 109-112
- Horan, A.H. (1971). The Suppression Of Inflammatory Edema At The Nidation Site By Sodium Salicylate And Nitrogen Mustard In The Rat. *Fertility and Sterility*, 22 (6), 392-397.
- Huang, J.C., Wun, W.S.A., Goldsby, J.S., Matijevic-Aleksic, N. & Wu, K.K. (2004). Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin enhances mouse embryo hatching. *Human Reproduction*, 19(12), 2900-2906.
- Huang, J-C, Wun, W-S.A., Goldsby, J.S., Egan, K., FitzGerald, G.A. & Wu, K.K. (2007). Prostacyclin receptor signaling and early embryo development in the mouse. *Human Reproduction*, 22 (11), 2851-2856.
- Jones, M.B., Chu, C.H., Pendleton, J.C., Betenbaugh, M.J., Shiloach, J., Baljinnyam, B., Rubin, J.S. & Shamlott, M.J. (2010). Proliferation and Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells Maintained on Type I Collagen. *Stem Cells and Development*, 19 (12), 1923-1935.
- Jong, M., Rauwerda, H., Bruning, O., Verkooijen, J., Spink, H.P. & Breit, T.M. (2010). RNA isolation method for single embryo transcriptome analysis in zebrafish. *BMC Res Notes*, 3 (73), 1-6.
- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J., Maruyama, T. Nagata, N., Lambert, S, Lefrançois-Martinez, A., Martinez, A. & Urade, Y. (2009). Prostaglandin F_{2α} Synthase Activities of Aldo-Keto Redutase 1B1, 1B3 and 1B7. *J. Biochem.*, 145 (2), 161-168.
- Kang, H.J., Hwang, S.J., Yoon, J.A., Jun, J.H., Lim, H.J., Yoon, T.K., & Song, H. (2011). Activation of peroxisome proliferatorsactivated receptor d (PPARd) promotes blastocyst hatching in mice. *Molecular Human Reproduction*, 17 (10), 653-660.
- Kaufman, M.H. (1999) *The Atlas of Mouse Development* (revised edition). London: Academic Press.
- Kemp, C., Willems, E., Abdo, S., Lambiv, L. & Leyns, L. (2005). Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. *Developmental Dynamics*, 233, 1064-1075.
- Kennedy, T.G. (1977). Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biology of Reproduction*, 16, 286-291.
- Kennedy, T.G. (1979). Prostaglandins and increased endometrial vascular permeability resulting from the application of artificial stimulus to the uterus of the rat sensitized for the decidual cell reaction. *Biology of Reproduction*, 20, 560-566.

- Kennedy, T.G., Gillio.Meina, C. & Phang, S.H. (2007). Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction*, 134, 635-643.
- Lewis, G.S. (1989). Prostaglandin secretion by the blastocyst. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 37, 261-267.
- Li, Y., Lu, W., King, T.D., Liu, C.C., Bijur, G.N. & Bu, G (2010). Dkk1 stabilizes Wnt co-receptor LRP6: implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *PLoS One*, 5(6), e11014.
- Li, L., Lu, X. & Dean, J. (2013). The maternal to zygote transition in mammals. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 919-938.
- Liedert, A., Wagner, L., Seefried, L., Ebert, R., Jakob, F. & Ignatius, A. (2010). Estrogen receptor and Wnt signaling interact to regulate early gene expression in response to mechanical strain in osteoblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 755-759.
- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., R.N., Trzaskos, J.M. & Dey, S.K. (1997). Multiple Female Reproductive Failures in Cyclooxygenase 2-Deficient Mice. *Cell*, 91, 197-208.
- Lim, H., Gupta, R.A., Ma, W., Paria, B.C., Moller, D.E., Morrow, J.D., DuBois, R.N., Trzaskos, J.M. & Dey, S.K. (1999). Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . *Genes & Development*, 13, 1561-1574.
- Lindstrom, T. & Bennett, P. (2004). Transcriptional regulation of genes for enzymes of the prostaglandin biosynthetic pathway. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70, 115-135
- Liu, X.-H., Kirschenbaum, A., Weinstein, B.M., Zaidi, M., Yao, S. & Levine, A.C. (2010). Prostaglandin E2 modulates components of the Wnt signaling system in bone and prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 715-720.
- Lloyd, S., Fleming, T.P. & Collins, J.E. (2003). Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development. *Gene Expression Patterns*, 3, 309-312.
- Lopes, F.L., Desmarais, J.A. & Murphy, B.D. (2004). Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction*, 128, 669-678.
- Luo, C., Zuñiga, J., Edison, E., Palla, S., Dong, W. & Parker-Thornburg, J. (2011). Superovulation Strategies for 6 Commonly Used Mouse Strains. *Journal of the American Association for Animal Laboratory Animal Science*, 50 (4), 471-478.
- Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J.A. & Fortier, M.A. (2003). An Aldose Reductase with 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity Is Most Likely the Enzyme Responsible for the Production of Prostaglandin F2 α in the Bovine Endometrium. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (13), 11205-11212.
- Mapletoft, R.J. (2006). Bovine embryo transfer. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*.

- Marshburn, P.B., Shabanowitz, R.B. & Clark, M.R. (1990). Immunohistochemical Localization of Prostaglandin H Synthase in the Embryo and Uterus of the Mouse From Ovulation Through Implantation. *Molecular Reproduction and Development*, 25, 309-316.
- Maurer, R.R. & Beier, H.M. (1976). Uterine proteins and development in vitro of rabbit preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 48, 33-41.
- Mindnich, R.D. & Penning, T.M. (2009). Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Humam Genomics*, 3 (4), 362-370.
- Mohamed, O.A., Dufort, D. & Clarke, H.J. (2004). Expression and Estradiol Regulation of Wnt Genes in the Mouse Blastocyst Identify a Candidate Pathway for Embryo-Maternal Signaling at Implantation. *Biology of Reproduction*, 71, 417-424.
- Mohamed, O.A., Jonnaert, M., Labelle-Dumais, C., Kuroda, K., Clarke, H.J. & Dufort, D. (2005). Uterine Wnt/ β -catenin signaling is required for implantation. *PNAS*, 102 (24), 8579-8584.
- Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K. & Kudo, I. (2003). Cellular Prostaglandin E₂ Production by Membrane-bound Prostaglandin E Synthase-2 via Both Cyclooxygenases-1 and -2. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278 (39), 37937-37947.
- Nagy, A. (Ed.). (2003). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Michigan: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nayeem, S.B., Dharmarajan, A. & Keelan, J.A. (2015). Paracrine communication modulates production of Wnt antagonists and COX1-mediated prostaglandins in a decidual-trophoblast co-culture model. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 405, 52-62.
- Ni, H., Sun, T., Ding, N-Z, Ma, X-H & Yang, Z-M (2002). Differential Expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase at Implantation Sites and in Decidual Cells of Mouse Uterus. *Biology of Reproduction*, 67, 351-358.
- Ni, H., Sun, T., Ma, X-H. & Yang, Z-M. (2003). Expression and Regulation of Cytosolic Prostaglandin E Synthase in Mouse Uterus During the Peri-Implantation Period. *Biology of Reproduction*, 68, 744-750.
- Niimura, S. & Ishida, K. (1987). Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E-2 in preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80, 505-508
- Nuñez, F., Bravo, S., Cruzat, F., Montecino, M. & De Ferrari, G.V. (2011). Wnt/b-Catenin Signaling Enhances Cyclooxygenase-2 (COX2) Transcriptional Activity in Gastric Cancer Cells. *PLoS ONE*, 6 (4), 1-10.
- Oshima, H. & Oshima, M. (2010). Mouse models of gastric tumors: Wnt activation and PGE₂ induction. *Pathology International*, 60, 599-607.
- Pakrasi, P.L. & Jain, A.K. (2007). Evaluation of cyclooxygenase 2 derived endogenous prostacyclin in mouse preimplantation embryo development in vitro. *Life Sciences*, 80, 1503-1507.

- Parr, M.B., Parr, E.L., Munaretto, K., Clark, M.R. & Dey, S.K. (1988). Immunohistochemical Localization of Prostaglandin Synthase in the Rat Uterus and Embryo during the Peri-Implantation Period. *Biology of Reproduction*, 38, 333-343.
- Pépin, N.L., Chapdelaine, P. & Fortier, M.A. (2013). Evaluation of the prostaglandin F synthase activity of human and bovine aldo-keto reductases: AKR1A1s complemente AKR1B1s as potente PGF synthases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 106, 124-136.
- Perleman School of Medicine - University of Pennsylvania (2017). AKR Superfamily. Table 1: *Members of the Aldo-keto reductase Superfamily*. Acedido em Ago. 1, 2017, disponível em <https://www.med.upenn.edu/akr/members.html>
- Peshkin, L., Wühr, M., Pearl, E., Haas, W., Freeman Jr., R.M., Gerhart, J.C., Klein, A.M., Horb, M., Gygi, S.P. & Kirschner, M.W. On the relationship of protein and mRNA Dynamics in vertebrate embryonic development. *Dev Cell*, 35 (3), 283-394.
- Pratt-Hyatt, M., Lickteig, A.J. & Klaassen, C.D. (2013). Tissue Distribution, Ontogeny and Chemical Induction of Aldo-Keto Reductases in Mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 41, 1480-1487.
- Ramathal, C.Y., Bagchi, I.C., Taylor, R.N. & Bagchi, M.K. (2010). Endometrial Decidualization: of mice and men. *Semin. Reprod. Med.*, 28 (1), 17-26.
- Rao, T.P. & Köhl, M. (2010). An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Circulation Research*, 106, 1798-1806.
- Reese, J., Brown, N., Paria, B.C., Morrow, J. & Dey, S.K. (1999). COX-2 compensation in the uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 150, 23-31.
- Ricciotti, E. & FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 31(5), 986-1000.
- Rocha, J.C., Passalia, F., Matos, F.D., Maserati Jr, M.P., Alves, M.F., Almeida, T.G., Cardoso, B.L., Basso, A.C. & Nogueira, M.F.G. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JRBA Assisted Reproduction*, 20 (3), 150-158.
- Roy, S.S. & Seshagiri P.B. (2013). Expression and function of cyclooxygenase-2 is necessary for hamster blastocyst hatching. *Molecular Human Reproduction*, 19(12), 838-851.
- Saint-Dizier, M., Grimard, B., Guyader-Joly, C., Humblot, P. & Ponter, A.A. (2011). Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in bovine in vitro-produced embryos. *Zigote*, 19, 277-283.
- Salleh, N. (2014). Diverse Roles of Prostaglandins in Blastocyst Implantation. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-11, article ID 968141.
- Sayre, B.L. & Lewis, G.S. (1993). Arachidonic acid metabolism during early development of ovine embryos: a possible relationship to shedding of the zona pelúcida. *Prostaglandins*, 45, 557-569.

- Sayre, B.L. (2007). Effect of prostaglandins E2 and F2 α on in vitro development and hatching of caprine blastocysts. *Small Rumin. Res.*, 67, 257–263.
- Scenna, F.N., Edwards, J.L., Rohrbach, N.R., Hockett, M.E., Saxton, A.M. & Schrick, F.N. (2004). Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 73, 215–226.
- Schrode, N., Xenopoulos, P., Piliszek, A., Frankenberg, S., Plusa, B. & Hadjantonakis, A.K. (2013) Anatomy of a blastocyst: cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo; *Genesis*, 51(4), 219-33
- Schultz, R.M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*, 8 (4), 323-331.
- Schwab, J.M., Schluesener, H.J., Meyermann, R. & Serhan, C.N. (2003). COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*, 69, 339-343.
- Shaftel, S.S., Olschowka, J.A., Hurley, S.D., Moore, A.H. & O'Banion, M.K. (2003). COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Molecular Brain Research*, 119, 213-215.
- Shao, J., Jung, C., Liu, C. & Sheng, H. (2005). Prostaglandin E2 Stimulates the β -Catenin/T Cell Factor-dependent Transcription in Colon Cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (28), 26565-26572.
- Sonderegger, S., Pollheimer, J. & Knöfler, M. (2010). Wnt Signaling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation. *Placenta*, 31 (10), 839-847.
- Soto, P., Natzke, R.P. & Hansen, P.J. (2003). Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2 α , and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 50, 263–272.
- Streck, R.D., Kumpf, S.W., Ozolins, T.R.S. & Stedman, D.B. (2003). Rat Embryos Express Transcripts for Cyclooxygenase-1 and Carbonic Anhydrase-4, But Not for Cyclooxygenase-2, During Organogenesis. *Birth Defects Research (Part B)*, 68, 57-69.
- Sugimoto, Y., Inazumi, T. & Tsuchiya, S. (2015). Review – Recent Progress in Lipid Mediators: Roles of prostaglandins receptors in female reproduction. *The Journal of Biochemistry*. 157 (2), 73-80.
- Sutherland, A. (2003). Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Developmental Biology*, 258, 241-251.
- Tan, H.N., Liu, Y., Diao, H.L. & Yang, Z.M. (2005). Cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in preimplantation mouse embryos. *Zygote*, 13, 103-108.

- Tanghe, S., Soom, A.V., Nauwynck, H., Coryn, M. & De Kruif, A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 414-424.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S. & Watanabe, K. (2002). Identification and Characterization of a Novel Type of Membrane-Associated Prostaglandin E Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291, 884-889.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M. & Kudo, I. (2000). Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E2 Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E2 Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (42), 32775-32782.
- Tepekoy, F., Akkoyunlu, G. & Demir, R. (2015). The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 32, 337-346.
- Theiler, K. (1989). The House Mouse: Atlas of Embryonic Development (2^{ed.}). Berlin:Springer-Verlag.
- Torres, A., Batista, M., Diniz, P., Mateus, L. & Lopes-da-Costa, L. (2013). Embryo–luteal cells co-culture: an in vitro model to evaluate steroidogenic and prostanoid bovine early embryo–maternal interactions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, 49, 134-146.
- Torres, A., Batista, M., Diniz, P., Silva, E., Mateus, L. & Lopes-da-Costa, L. (2014). Effects of oocyte donor age and embryonic stage of development on transcription of genes coding for enzymes of the prostaglandins and progesterone synthesis pathways in bovine in vitro produced embryos. *Zygote*, 1 (6), 1-11.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, 40 (15), e115
- Vilella, F., Ramirez, L., Berlanga, O., Martinez, S., Alamá, P., Meseguer, M., Pellicer, A. & Simón, C. (2013). PGE2 and PGF2 α Concentrations in Human Endometrial Fluid as Biomarkers for Embryonic Implantation. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 98 (10), 4123-4132.
- Vogel, C. & Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.*, 13(4), 227–232.
- Wang, D., Mann, J.R. & DuBois, R.N. (2004). WNT and cyclooxygenase-2 Cross-talk Accelerates Adenoma Growth. *Cell Cycle*, 3 (12), 1512-1515.
- Wang, H. & Dey, S.K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews – Genetics*, 7, 185-199.
- Wang, X., Su, Y., Deb, K., Raposo, M., Morrow, J.D., Reese, J. & Paria, B.C. (2004b). Prostaglandin E2 is a product of induced prostaglandin-endoperoxide synthase 2 and microsomal-type prostaglandin E synthase at the implantation site of the hamster. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 30579–30587.

Watanabe, K. (2002). Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68-69, 401-407.

- van der Weiden, R.M.F., Wisse, L.J., Helmerhorst, F.M., Keirse, M.J.N.C. & Poelmann, R.E. (1996). Immunohistochemical and ultrastructural localization of prostaglandin H synthase in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107, 161-166.
- Wellstead, J.R., Bruce, N.W. & Rahima, A. (1989). Effects of Indomethacin on Spacing of Conceptuses Within the Uterine Horn and on Fetal and Placental Growth in the Rat. *The Anatomical Record*, 225, 101-105.
- White, M.D., Bissiere, S., Alvarez, Y.D. & Plachta, N. (2016). Mouse Embryo Compaction. *Current Topics in Developmental Biology*, 120, 235-258.
- Wu, C., Yan, L., Depre, C., Dhar, S.K., Shen, Y., Sadoshima, J., Vatner, S.F., & Vatner, D.E. (2009). Cytochrome c oxidase III as a mechanism for apoptosis in heart failure following myocardial infarction. *Am J Physiol*, 197, C928-C934.
- Xie, H., Tranguch, S., Jia, X., Zhang, H., Das, S.K., Dey, S.K., Kuo, C.J. & Wang, H. (2008). Inactivation of Wnt- β -Catenin Signaling Limits Blastocyst Competency for Implantation. *Development*, 135 (4), 717-727.
- Yamamoto, H., Sakane, H., Yamamoto, H., Michiue, T. & Kikuchi, A. (2008). Wnt3a and Dkk1 Regulate Distinct Internalization Pathways of LRP6 to Tune the Activation of b-Catenin Signaling. *Developmental Cell*, 15, 37-48.
- Yoshinaga, K. (1988). Uterine Receptivity for Blastocyst Implantation. *Annals New York Academy of Sciences*, 541, 424-431.
- Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H. & Armant, D.R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo impantation. *Mol. Aspects Med.*, 34 (5), 939-980.
- Zhao, S. & Fernald, R.D. (2005). Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Computational Biology*, 12 (8), 1047-1064.